

Comunicazioni libere (Poster)

Codice Poster	Argomenti
• 001 - 002	Analisi decentrate
• 003 - 004	Applicazioni informatiche
• 005 - 008	Automazione e gestione del laboratorio
• 009 - 056	Biologia molecolare
• 057 - 068	Coagulazione
• 069 - 082	Controllo e gestione della qualità
• 083 - 089	Diabete
• 090 - 100	Ematologia
• 101 - 110	Endocrinologia
• 111 - 133	Farmacologia e tossicologia
• 134 - 148	Immunologia, autoimmunità
• 149 - 154	Immunometria
• 155 - 157	Lipidi, lipoproteine
• 158 - 180	Marcatori cardiaci
• 181 - 187	Marcatori di neoplasia
• 188 - 194	Medicina e sport
• 195 - 217	Proteine ed enzimi
• 218 - 244	Studi clinici
• 245 - 259	Valutazione di strumenti e prodotti
• 260 - 266	Varie

001

VALUTAZIONE DEL SISTEMA PER EMOGASANALISI GEM PREMIER 3000 CON IQM IN UN CONTESTO OPERATIVO REALE. UN ESEMPIO DI TECNOLOGIA AVANZATA A SUPPORTO DELLA PATIENT SAFETY

P. Carraro¹, G. Bonaccorso², E. Babetto¹, N. Di Vitofrancesco¹, M. Chiarion Casoni³, A. Tonoli³, M. Plebani¹

¹Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università e ULSS 16, Padova

²U.O. di Anestesia e Rianimazione, Azienda Ospedaliera-Università, Padova

³Instrumentation Laboratory, Milano

Scopo. Il contesto operativo delle analisi decentrate richiede un'attenta gestione della qualità analitica. Tale funzione è stata automatizzata nel sistema Gem Premier 3000 della Instrumentation Laboratory (Milano, Italia) mediante l'adozione della "Gestione Intelligente della Qualità" IQM. Ne abbiamo quindi valutato l'efficacia in un contesto operativo reale.

Materiali e metodi. Due strumenti sono stati collocati in Laboratorio d'Urgenza e presso un reparto di Rianimazione ed utilizzati per un periodo di due mesi in condizioni di carichi di lavoro di routine. Sono stati affidati a 16 e 20 diversi operatori in Laboratorio e in Rianimazione. Sono stati anche eseguiti controlli di qualità quotidiani tradizionali con soluzioni acquose in fiale monouso. La valutazione statistica della stabilità delle variabili analizzate è stata ottenuta mediante metrica sigma rispetto ai requisiti CLIA. E' stata anche valutata l'interferenza da benzalconio cloruro mediante supplementazione a diverse concentrazioni.

Risultati. Durante la valutazione in alcune occasioni si è documentato l'intervento immediato del sistema IQM mediante lavaggi aggiuntivi e ricalibrizioni automatiche. La valutazione dei risultati di controllo di qualità ha mostrato CV in linea con i migliori standard dello stato dell'arte in emogasanalisi. Particolarmente significative le performance del pH con oltre 10 sigma e del potassio, superiore a 16 sigma. Le variabili critiche si sono dimostrate la pCO₂ e il glucosio, limitatamente ai livelli più bassi di concentrazione, dove comunque la varianza delle misure era inferiore ai 3 sigma.

Il benzalconio si è confermato un potente interferente sulla determinazione di sodio e calcio fino alla concentrazione di 0,17 mg/L. Lo strumento però ne rileva e segnala la presenza.

Conclusioni. Gli analizzatori valutati si sono dimostrati affidabili ed il sistema IQM è stato in grado di garantire continuamente performance ottimali.

Bibliografia. Westgard JO, Westgard SA. The quality of laboratory testing today: an assessment of sigma metrics for analytic quality using performance data from proficiency testing surveys and the CLIA criteria for acceptable performance. Am J Clin Pathol. 2006 Mar;125(3):343-54.

002

VALUTAZIONE DI UNO STRUMENTO POINT OF CARE PER ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

A. Cassia¹, G. De Meo¹, F. Vittorio¹, A. Totaro¹, T. Granato¹, L. di Mauro¹

¹S.I.M.T. Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti" - OO.RR. Foggia

Scopo d.l. Utilizzazione di uno strumento POC per la valutazione pre-donazione dell'emocromo (e.) nel SIMT e nei centri mobili di prelievo. La normativa prevede che "prima di ogni donazione il candidato donatore deve essere sottoposto all'esame per la determinazione dell'Hb o dell'Hct. Presso il nostro Servizio veniva effettuata la determinazione dell'Hb pre-donazione mediante digitopuntura e il prelievo per e. completo al termine della donazione. Spesso, abbiamo avuto discrepanze, tra il valore dell'Hb pre e post-donazione ed inoltre c'era l'aggravio di un doppio costo. Alla luce di queste due "non conformità", di spesa e di analisi, rilevate dal Sistema Qualità, si è pensato di ovviare al problema "costo" di avere parametri più completi per l'ammissione alla donazione senza che il donatore subisca il trauma del doppio prelievo. Materiali e Metodi. E' stato messo in sperimentazione il sistema MICROS 60 (ABX HARIBO) che permette di effettuare l'e. completo pre-donazione mediante digitopuntura permettendo la determinazione di 18 parametri da sangue intero. A 186 donatori è stato effettuato un doppio prelievo: una digitopuntura ed un prelievo per e. esaminato al Micros 60 è stato inviato al Laboratorio dove sono stati analizzati con l'Advia 120 (Bayer Diagn.) Risultati. I vari confronti hanno evidenziato la sovrapponibilità dei risultati sia tra quelli della digitopuntura e la conta fatta al Micros 60 sia tra quelli del Micros 60 e quelli avuti da Laboratorio; le discrepanze sono state in media di 0.15 g/dl per il valore dell'Hb, di 0.2×10^6 per le emazie, di 0.2×10^3 per i leucociti e di 0.3×10^3 /mmc per le Plt. Conclusioni. Si può affermare che il sistema per la determinazione dell'e. mediante digitopuntura MICROS 60 si è dimostrato affidabile e di semplice esecuzione; permette un buon risparmio di tempo e di risorse economiche e ci dà la possibilità di poter valutare l'e. completo prima della donazione; questo risulta utilissimo per i donatori di piastrine per i quali possiamo avere la conta piastrinica non utilizzando gli accessi venosi del potenziale donatore.

003

SISTEMA INFORMATICO DI LABORATORIO: SISTEMA DI MONITORAGGIO DEI PROCESSI INFORMATICI

A. Pinato¹, G. Vecchiato¹, M. Plebani¹

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

I dati di laboratorio sono oggi gestiti da un sistema informatico (LIS) più o meno complesso sulla base delle esigenze dello specifico Servizio. Particolare attenzione viene dedicata a questo aspetto anche dallo Standard Internazionale di accreditamento ISO 15189:2003 che riporta specifici requisiti per un'adeguata gestione del LIS. Scopo del lavoro è presentare un software sviluppato presso il nostro Dipartimento che permette il monitoraggio delle attività informatiche di laboratorio in modo indipendente, personalizzabile in tutte le realtà e soprattutto efficace.

Le molteplici interazioni tra sistemi informatici nei laboratori analisi e le integrazioni con i sistemi aziendali richiedono un costante monitoraggio dell'effettivo funzionamento dei sistemi collegati. Il sistema permette tra l'altro di verificare in tempo reale:

- le connessioni di rete (per es. server centrali e stampanti)

- la disponibilità di servizi (accesso ai dati, pubblicazione pagine web, ecc.)

- l'effettivo scambio di dati tra sistemi (ricezione messaggi, invio referti, ecc.)

Ad ogni cambio di stato (in funzione, in allarme, in blocco, in assenza di informazioni) il sistema invia istantaneamente un messaggio (e-mail e/o SMS) con l'indicazione del processo interessato ed i relativi dettagli, differenziando i destinatari in relazione al tipo di servizio monitorato, all'ora ed al tipo di messaggio.

Il sistema inoltre, attraverso un Server, pubblica una pagina WEB che indica lo stato dei singoli monitoraggi indicando con dei colori il funzionamento: regolare (verde); in blocco (rosso); allarme (giallo); in assenza di informazioni (viola).

Il software, inoltre, è in grado di produrre un report dettagliato che riassume il tempo di inattività dei processi e funge da indicatore per individuare le aree più critiche per l'intero sistema che necessitano quindi di particolare attenzione.

Tale sistema ha permesso l'inversione della segnalazione del processo di allarme: non è più l'utente finale (personale del laboratorio o reparti) che segnala un problema, ma è il referente del LIS che viene immediatamente a conoscenza del tipo di problema nel modo più appropriato, e può quindi intervenire autonomamente, garantendo così una maggior tempestività in fase di risoluzione.

004

IL SISTEMA INFORMATICO COME STRUMENTO DI MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DEI PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ

L. Zardo¹, L. Sciacovelli¹, S. Secchiero¹, S. Busetto², G. De Pieri², M. Plebani¹

¹Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

²CSI Net S.r.l. - Servizi Informatici, Mogliano Veneto (TV)

L'implementazione di un software dedicato alla gestione dei dati relativi ai Programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) è un processo molto complesso e delicato che deve tener conto di alcuni aspetti molto importanti e, per questo, non può prescindere dalla collaborazione tra lo specialista informatico ed il gestore di Programmi di VEQ.

Le specifiche richieste ad un software di questo tipo dagli organizzatori di VEQ sono: - garanzia di sicurezza e riservatezza dei dati; - correttezza e ripetibilità dell'elaborazione dei dati in conformità al modello statistico richiesto; - praticabilità del sistema per gli utilizzatori; - versatilità relativamente alla tipologia degli Schemi, al modello statistico, alla verifica ed interpretazione dei dati, alla presentazione dei risultati; - velocità delle singole operazioni (introduzione risultati, elaborazione dati, preparazione rapporti).

Scopo di questo lavoro è presentare i vantaggi ottenuti dall'implementazione di un nuovo software per la gestione degli Schemi di VEQ gestiti dal Centro di Ricerca Biomedica (CRB).

A titolo di esempio vengono riportati i tempi necessari per espletare alcune attività dello Schema di VEQ per i Marcatori Cardiaci che conta 170 laboratori partecipanti ed un volume di dati pari a circa 20000 per Ciclo. Il tempo di elaborazione statistica dei dati è stato abbattuto da 10 minuti a 3 minuti e considerando che per ogni esercizio l'elaborazione viene effettuata circa 10 volte per individuare e valutare le correzioni apportate, vi è un notevole risparmio di tempo. Inoltre, le fasi di stampa, assemblaggio, imbustamento e spedizione dei rapporti periodici sono state completamente informatizzate mediante la pubblicazione nell'area riservata del sito web del CRB, accessibile con password, dei report periodici in formato pdf non modificabile (con un risparmio di tempo pari a 35 ore/uomo).

Lo sviluppo del nuovo sistema informatico ha permesso, inoltre, la gestione controllata di tutti i parametri variabili da un esercizio all'altro (codici campioni, n° esercizio, esclusioni di prestazioni o di dati statistici) permettendo l'archiviazione dei dati relativi a più esercizi nello stesso database con possibilità di avere un immediato confronto dei dati nel tempo senza pericolo di errore.

005

CONTA DEGLI ELEMENTI FIGURATI SU URINE DI RACCOLTA DI 24 ORE CON CITOFUORIMETRO UF100, VALORI OSSERVATI

M. Falcone¹, M. A. Prencipe¹, F. Tagliati¹, F. Simone¹

¹1° Laboratorio Analisi Cliniche, OO. RR. di Foggia, Az. Ospedaliero Universitaria

La Conta di Addis trova applicazione nello studio di perdita di emazie, leucociti cellule renali e cilindri in raccolta di 12 h, ciò nell'intento di ponderare le perdite totali.

Scopo del lavoro. Rendere le conte degli elementi figurati delle urine di raccolta di 12 h o 24 h automatizzabile su citofluorimetro UF100 (Sysmex).

Dati. Sono stati esaminati 59 campioni di urine di raccolte di 24 h che arrivavano al Laboratorio da pazienti ambulatoriali per esami di chimica clinica e non per la valutazione di perdita di emazie o leucociti, quindi pazienti non in osservazione per patologie nell'ambito delle malattie nefrologiche – renali, ciò nell'intento di avere dati non francamente patologici per abbozzare dei range di riferimento. L'UF100 espone i dati in numero di elementi per ul e informa anche se le conte sono valide. E' stato eseguito il calcolo per riportare i dati alle raccolte di 24 h ed avere così la perdita totale di elementi. Sono stati trovati i seguenti dati:

Medie: Emazie 32.300.000, Leucociti 76.500.000, Cellule epiteliali 15.000.000.

Valori minimi / massimi: emazie 950.000 / 355.200.000; leucociti 2.200.000 / 1.700.000.000; cell. Ep. 0 / 146.000.000. I dati suddivisi in percentili sono i seguenti: 5° centile emazie / leucociti / c. epit. 2.185.000 / 3.500.000 / 1.100.000; 50° centile 13.600.000 / 15.200.000 / 7.200.000; 75° centile 32.700.000 / 31.700.000 / 19.200.000.

Conclusioni. Ampliando la ricerca potrebbe essere proponibile un conteggio automatico degli elementi figurati delle urine di raccolta di 12 h o 24 h su citofluorimetro con attendibili valori di riferimento. Da questi dati si potrebbero proporre i seguenti valori di riferimento: emazie < 30.000.000, Leucociti < 30.000.000, cell. Epit. < 20.000.000. I dati si discostano molto dai conteggi effettuati con microscopio che risentono molto della operatività della routine di laboratorio.

006

PROFILI DIAGNOSTICI PER I PAZIENTI DEL PRONTO SOCCORSO

A. Frezzotti¹, M. D. Solenghi¹, L. Finaurini¹, S. Polonara², M. Tocchini¹

¹Lab. Analisi Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I, Lancisi, Salesi, Ancona

²Pronto Soccorso Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I, Lancisi, Salesi, Ancona

Scopo. Per fornire informazioni utili per le decisioni diagnostico-terapeutiche in breve tempo sono stati definiti profili di test orientati alle situazioni cliniche più frequenti che si osservano in Pronto Soccorso (PS).

Materiali e Metodi. Un gruppo di lavoro, costituito da operatori del Laboratorio e del PS, ha revisionato i profili diagnostici già in uso da due anni. Sono state considerate 10 situazioni cliniche segnalate al triage con codice giallo e verde. Dalla consultazione di linee guida, banche dati e sulla base di esperienze personali sono stati ridefiniti 10 nuovi profili per le richieste di esami. Le variazioni hanno riguardato Troponina I, Mioglobina, CKMB, urea, AST, ALT, amilasi e fibrinogeno. I profili comprendono in media 10 test e vengono richiesti al triage in relazione alla situazione clinica evidente, così che i risultati sono disponibili al medico nel corso della visita. Per una migliore definizione del quadro clinico possono essere richiesti in tempi successivi ulteriori esami tra quelli eseguibili in urgenza o anche da eseguire in routine il giorno successivo. I dati dei due mesi dall'introduzione dei nuovi profili sono stati confrontati con quelli dei due mesi precedenti ed è stato realizzato con gli operatori del PS un incontro di approfondimento per affrontare eventuali problemi e raccogliere osservazioni.

Risultati. Il numero totale di esami del PS è diminuito del 10% e la media di esami per richiesta è passata da 12,3 a 8,2. Per Troponina I e CKMB si è osservato un calo del 14% e per mioglobina del 2%; l'urea ha registrato un calo del 43%, AST e ALT un calo del 12%; l'amilasi un calo del 90% e il fibrinogeno del 53%, I medici del PS non hanno evidenziato nella gestione dei pazienti problemi riferibili all'adozione dei nuovi profili

Conclusioni. I risultati riportati dalla nostra esperienza indicano la concreta possibilità di contenere i test inappropriati con conseguente riduzione dei tempi di risposta e miglioramento dell'efficacia complessiva del laboratorio. Ne consegue la possibilità di disporre di risorse umane ed economiche da indirizzare ad attività e test di maggior rilievo.

Bibliografia. Knott JC Impact of blood testing on patient disposition from the emergency department. Emerg Med 2003; 15:121-5

007

CONSIDERAZIONI SULL'ACCORPAMENTO DI DUE LABORATORI ANALISI E RELATIVA RIORGANIZZAZIONE DELLE ATTIVITA'

A. Montani¹

¹Patologia Clinica, Osp. Civico, Casalpusterlengo (LO)

Tutta la diagnostica dell'Azienda Ospedaliera della provincia di Lodi era parcellizzata su quattro ospedali in un raggio di circa 30 Km; si trattava di attività replicate sia per la routine che per le urgenze. Ciò comporta inevitabilmente un incremento di spesa, una cattiva distribuzione del personale e notevoli difficoltà di collegamento per assenza di trasporti dedicati (1).

Da ottobre 2004 si è provveduto, in una prima fase, a far confluire le attività di laboratorio di Casalpusterlengo e Codogno, mantenendo nella prima sede le urgenze diurne.

Ponendo a confronto il numero di esami effettuato nel primo trimestre del 2005 e nel corrispondente periodo del 2006, si può notare che gli esterni non hanno presentato differenze significative passando per Casalpusterlengo da 61985 a 62702 con un incremento del 1% e per Codogno da 100634 a 103799 con un incremento di circa il 3%.

Per quanto riguarda gli esami interni richiesti in regime di routine, si è passati per Casalpusterlengo da 30318 a 29263 con un decremento di circa il 3.5% e per Codogno da 44617 a 45544 con un incremento del 2%; anche in questo caso non si hanno variazioni significative essendo le differenze essenzialmente legate al trasferimento presso l'Ospedale di Codogno di alcuni reparti di degenza.

Diversa è invece la situazione per quanto riguarda le richieste di esami interni in regime di urgenza dove si evidenzia una riduzione per Codogno da 45688 a 28433 ed un relativo decremento di circa il 38% ed un incremento per Casalpusterlengo da 3571 a 7541 con una percentuale corrispondente di circa il 111%.

Ritengo che creare megalaboratori e staccare di fatto la produzione dal contesto clinico, non possa certo rispondere a criteri di logica diagnostica e non possa non aumentare l'inappropriatezza della richiesta fornendo non certo economicità di scala ma bensì aumento di costi complessivi.

L'attivazione di laboratori monotematici consentirebbe, a mio parere, un efficace risparmio di costi ed una miglior utilizzazione del personale.

Bibliografia. Montani A.N., *Biochim.Clin.* 28, 63, 2004

008

IL MONITORAGGIO DEL TAT: QUALI INDICATORI E QUALI ELABORAZIONI?

M. Tagliazucchi¹, M. C. Casolari¹, W. Tizzanini¹, F. Guidetti¹, A. Carbonieri¹

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico di Modena

Premessa. Nell'ambito delle riorganizzazioni su larga scala dei laboratori la rilevazione e il controllo dei tempi di risposta rappresentano un aspetto essenziale della qualità del servizio reso agli utenti, che devono ricevere gli esami appropriati nei tempi adeguati. E' necessario orientare le risorse verso le effettive necessità degli utenti, ma si deve anche disporre di uno strumento capace di verificare il livello di adesione all'impegno assunto.

Obiettivi. Individuare indicatori accurati e sensibili per effettuare un monitoraggio efficiente ed efficace del TAT in funzione di quanto dichiarato nello standard di prodotto/servizio.

Metodologia. Abbiamo utilizzato negli anni diversi tipi di indicatori/elaborazioni:

- 1) Tempo medio di refertazione di un periodo limitato;
- 2) Tempo medio di refertazione per mese;
- 3) Tempo per completare il 90% dei referti e numero di referti/risultati validati in 1 ora (report mensile per reparto e/o totale);
- 4) Sintesi annuale degli indicatori 3) con media e deviazione standard delle medie mensili per valutare il grado di dispersione di questo risultato durante l'anno;
- 5) Mediana mensile delle percentuali giornaliere degli outliers sul percorso di routine con TAT 2 ore.

Risultati. L'indicatore 3) evidenzia differenze significative tra PS e urgenze degli altri reparti. L'indicatore 5) risulta il più adeguato per le linee analitiche di routine. Quotidianamente viene stampata una carta di controllo con gli indicatori prescelti (3 e 5) che offre agli operatori un feedback immediato tra risultati ottenuti e modalità operative della giornata, ricollegando eventuali ritardi a problemi strumentali, informatici e di personale.

Conclusioni. Con gli indicatori 3, 4, 5 si dispone di strumenti oggettivi in grado di: confrontare diversi periodi di lavoro e diversi gruppi di operatori; fare una analisi delle condizioni di lavoro; ottenere gli elementi per attivare azioni correttive volte al miglioramento continuo del servizio. Manca purtroppo ancora la condivisione degli indicatori per effettuare un confronto realistico tra laboratori.

Bibliografia. NovisD.A. e al Continuous monitoring of stat and routine outlier TAT:two CAP Q-Tracks monitors in 291 hospitals; *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004 Jun;128(6):621-6

009

LOSS OF BIOTHER (BIOTINYLATED TRASTUZUMAB) REACTIVITY BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC) PREDICTS TRASTUZUMAB FAILURE IN HER2-OVEREXPRESSING BREAST CANCER

E. Allia¹, A. Sapino¹, E. Ferrero², M. Campiglio³, G. Bussolati¹

¹Dip. Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Torino, Torino

²Dip. Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino, Torino

³Dip. Oncologia Sperimentale, Università di Milano, Milano

Introduction. The frequently observed inconsistent response to Trastuzumab, a humanized monoclonal antibody (HuMAb) approved for the treatment of patients with breast cancer overexpressing HER2, led us to introduce Biotinylated Trastuzumab (BioTHER) as immunocytochemical marker to quantify on tissue sections the binding site of the HuMAb. BioTHER reacts only with a subgroup of HER2-amplified tumors and identifies patients with increased response and reduced risk of tumor progression and death. Nevertheless a subgroup of amplified tumors showed BioTHER negativity suggesting the existence of HER2 molecular variants involved in the treatment resistance. Δ HER2 is an in frame alternative splicing of exon 16 in the C-terminal of the Trastuzumab binding site that has been shown to interfere with response to treatment.

Aim. The aim of this study was to analyze the setting of Wild Type (WT) HER2 and Δ HER2 mRNAs in a series of breast carcinomas by means of real time PCR and to compare the results with gene amplification and immunoreactivity with BioTHER, the PolyAb Herceptest and the MoAbs TAB250 and CB11.

Materials and Methods. Thirtyfour breast carcinomas were screened by FISH for gene amplification, by IHC for protein expression of the extracellular domain using TAB250 and BioTHER and of the intracellular domain using Herceptest and CB11 and, finally, by real-time PCR to determine the relative quantization of WT-HER2 and Δ HER2 mRNAs.

Results. BioTHER negativity identified the 5/18 patients with HER2 amplification and a 3+ score with routine antibodies, that did not respond to Trastuzumab. By quantitative PCR analysis, these tumors were found to express the highest levels of Δ HER2 mRNA.

Conclusions. Access to juxtamembrane BioTHER epitope in IHC may be blocked once a certain threshold of Δ HER2 expression is reached, perhaps because of the prevalence of non-BioTHER binding HER2 dimers. These may also adversely affect Trastuzumab binding in vivo, which, coupled to the intrinsically more aggressive behavior of high-HER2 expressing tumors, may help to explain the failure of Trastuzumab treatment.

Reference. Bussolati G et al 2005. A modified Trastuzumab antibody for the immunohistochemical detection of HER2 overexpression in breast cancer. *Br J Cancer* 11;92:1261-7

010

STATO MUTAZIONALE DEL GENE IGVH E PROGRESSIONE DI MALATTIA IN PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA (LLC)

M. Beretta¹, S. Besana¹, C. Colombo¹, A. Perego², S. Signorini¹, A. Soccodato², P. Tramacere¹, P. Mocarelli¹

¹Servizio Universitario di Medicina di Lab, Osp. di Desio (MI)

²Divisione di Ematologia Adulti, Osp San Gerardo dei Tintori Monza (MI)

Introduzione. La LLC presenta un andamento clinico eterogeneo ed i sistemi di stadiazione attualmente in uso non sono in grado di predire il decorso della malattia fin dal suo esordio (1). La ricerca di nuovi fattori prognostici assume quindi importanza per la gestione dei pazienti. Lo stato mutazionale del gene IgVH è associato a progressione di malattia: una condizione di non mutazione è infatti indice di prognosi sfavorevole (2). **Scopo.** Valutare la correlazione tra stato mutazionale, appartenenza del clone linfocitario ad una specifica famiglia del gene IgVH e tempo di raddoppio linfocitario come indice di progressione clinica di malattia.

Materiali e Metodi. Sono stati studiati 114 pazienti affetti da LLC in cura presso le Divisioni di Medicina dei nostri ospedali. Il gene IgVH è stato esaminato tramite sequenziamento automatico (ABI PRISM 310, Applied Biosystems) e considerato non mutato se l'omologia calcolata era superiore al 98% (V-BASE).

Risultati. Le famiglie del gene IgVH rappresentate prevalentemente nella nostra casistica sono: VH3 (47%), VH4 (32%) e VH1 (14%). Il 25% (29/114) dei pazienti analizzati presenta il gene IgVH non mutato (VH-NM) e i rimanenti 85/114 mutato (VH-MUT). Il 69% (20/29) dei VH-NM e il 40% (34/85) dei VH-MUT registrano un raddoppio linfocitario rispettivamente a 19.5 mesi e a 33.8 mesi (p=0.02). Il 62% (18/29) dei VH-NM e il 25% (21/85) dei VH-MUT hanno effettuato terapia. Le famiglie VH1 (41%), VH4 (31%) e VH3 (24%) sono le più frequenti nei VH-NM e VH3 (55%), VH4 (33%) nei VH-MUT.

Indipendentemente dallo stato mutazionale la famiglia VH1 (16/114) è associata a decorso peggiore in quanto il 75% dei casi (12/16) presenta raddoppio linfocitario e necessita di terapia.

Conclusioni. Lo studio dello stato mutazionale del gene IgVH nei pazienti affetti da LLC ha permesso di evidenziare una correlazione con la progressione della malattia. Nei pazienti con gene VH-NM si osserva un precoce raddoppio linfocitario e un maggior ricorso alla terapia rispetto ai pazienti VH-MUT. Anche il tipo di famiglia IgVH sembra essere associato a diverso grado di progressione di malattia.

Bibliografia. N.Chiorazzi et al. *N. Engl. J. Med* 2005;19:750-58. D.Kienle et al. *Blood* 2006;107:2020-2093.

011

SCREENING PER EMOCROMATOSI IN UNA POPOLAZIONE DI STUDENTI DELL'AREA BRIANZA

S. Besana¹, S. Signorini¹, M. Beretta¹, F. Sciarini¹, G. Casella², V. Baldini², P. Mocarelli¹

¹Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio Osp. di Desio (MI)

²Divisione di Medicina Osp. di Desio (MI)

Introduzione. L'emocromatosi ereditaria (HH) è una malattia genetica autosomica recessiva, caratterizzata da accumulo di ferro nell'organismo e sviluppo di danno d'organo irreversibile (fegato, cuore, pancreas, etc).

È la malattia genetica più comune nel mondo occidentale: prevalenza stimata 1-5/1000 (portatori 9-15/100). Rispetto ai malati identificati, esistono tuttavia numerose persone che ignorano il loro stato ed i rischi correlati. La diagnosi si basa su test biochimici e molecolari. La forma più comune è dovuta alla mutazione C282Y del gene HFE. Lo screening della popolazione generale è controverso, anche se l'HH soddisfa molti criteri delle linee guida WHO. Al momento lo screening fenotipico (dopo i 30aa) sembra l'approccio più corretto al problema. Scopo. Valutare una procedura di screening per HH negli studenti dell'ultimo anno di scuole superiori dell'Area Brianza.

Materiali e Metodi. Da Febbraio 2004 a Maggio 2006 sono stati studiati 2024 soggetti (1115 M e 909 F, età media 19.8aa) tramite determinazione di ferro e transferrina plasmatici e calcolo della % di saturazione della transferrina (TS%). I soggetti con TS%>45 sono stati richiamati per ripetere i test biochimici (con aggiunta di ferritina, AST, ALT) ed eseguire i test molecolari (mutazioni dei geni HFE, TFR2 e FPN1).

Risultati. Dei 2024 soggetti studiati, 222 (11%) sono stati richiamati e 100 (5%) hanno accettato di sottoporsi al prelievo di controllo per i test biochimici ed eseguire il test genetico: in 31 si è confermata una TS%>45.

Il test molecolare è risultato negativo in 54 soggetti (in 10 tuttavia confermata una TS%>45), mentre in 46 soggetti sono state riscontrate mutazioni nel gene HFE, con TS%>45 in 21 di essi.

In particolare, in 7 soggetti è evidenziabile un genotipo (3 eterozigosi miste: 2 C282Y/H63D e 1 C282Y/S65C; 2 eterozigosi C282Y e 2 omozigosi H63D) e fenotipo (TS%= 68, 94, 74, 50, 85, 60, 51 rispettivamente) compatibile con HH.

Conclusioni. I dati relativi ai richiami, pur con una compliance del 45,1%, mostrano una prevalenza di malattia in linea coi dati attesi (7/2024=0.34%). Il nostro studio evidenzia che l'HH è individuabile precocemente eseguendo lo screening in ambiente scolastico.

Bibliografia. Qaseem A, et al. Ann Intern Med 2005;143:517-21

012

IVS14+1G>A MUTATION AND 5-FLUOROURACIL TOXICITY

S. Betteto¹, G. Priolo¹, E. Ferrero¹, R. Volpatto², O. Bertetto²

¹Laboratorio di chimica clinica, A.S.O. San Giovanni Battista, Torino

²Oncologia Medica, A.S.O. San Giovanni Battista, Torino

5-fluorouracil (5-FU) is the most common chemotherapeutic agent used as adjuvant treatment in colorectal cancer as well as in other cancers of gastrointestinal tract, breast, head and neck. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is the initial and rate-limiting enzyme in the catabolism of 5-FU and IVS14+1G>A mutation is increasingly being recognised as a genetic factor predisposing patients to the development of severe 5-FU toxicity.

We evaluated 166 consecutive patients undergoing clinical follow-up to identify those subjects with an increased risk of development of severe 5-FU toxicity. Patients were classified into five groups according to the severity of neutropenia, mucositis, diarrhea, dermatitis and alopecia: grade 1 or heavy toxicity, grade 2 or moderate toxicity, grade 3 or severe toxicity, grade 4 or life-threatening toxicity, and grade 5 or death. Controls were considered of grade 0. The detection of IVS14+1G>A mutation was carried out on blood samples and assay was based on polymerase chain reaction (PCR) and reverse-hybridization.

Differences in the frequency of the mutation among considered patient subgroups were tested using the chi-square analysis and statistical significance was considered at p<0.05.

We didn't find homozygosity for the IVS14+1G>A mutation, whereas 19 out of enrolled patients (11%) were found to be carriers of the DPYD gene mutation. Although DPD enzymatic deficiency has been associated with either low toxicity, including haematological, gastrointestinal and flu-like symptoms (grade G1-G2), or high toxicity related to life-threatening complications, from mucositis and fourth grade neutropenia to coma and death (grade G3-G5), our findings demonstrated that the common splice site mutation was detectable only in the group of patients with high toxicity (G3-G4). Thirty percent of these patients (19 out of 59) were carriers of the studied mutation.

The method used in the present work appears relatively simple as compared to other proposed approaches and may offer the potential for cost-effective screening programs devoted to the identification of patients at risk of developing severe toxicity in 5-FU based chemotherapeutic regimens.

Reference. Van Kuilenburg A.B.P., Cancer Investigation, 24:215-217, 2006.

013

TAURINA: POSSIBILE RUOLO PROTETTIVO NELLA CARDIOPATIA ISCHEMICA

L. Bianchi¹, C. Venturi¹, M. A. Colivicchi², M. G. Parrillo¹, F. Forese¹, L. Della Corte², W. Vergoni¹

¹Osp. Ss Cosma e Damiano ASL3, Pistoia

²Dip. di Farmacologia PreClinica e Clinica, Firenze

Tra i metaboliti della metionina (MET) 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 di questo studio è valutare: 1) se i livelli di TAU plasmatici differiscono fra i soggetti SANI e soggetti affetti da malattia coronaria acuta (CAD); 2) quanto sia possibile normalizzarli rispetto a parametri biochimici coinvolti (metionina) e non coinvolti (glutammato e aspartato) nella via metabolica.

Metodologia. In una popolazione di 140 pazienti con CAD e una di 120 soggetti SANI, sovrapponibili per età, distribuzione fra i sessi ed incidenza dei fattori di rischio tradizionali, sono stati determinati: i livelli di TAU, MET ed altri aminoacidi 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), vitamina B6 e B12 con metodica radioimmunologica. La gravità della malattia coronaria è stata definita utilizzando il Gensini Cardio Score (GCS)

Risultati. 1) I CAD presentano livelli rispettivamente inferiori e superiori di TAU e HCY plasmatici rispetto ai SANI ($P < 0.05$, Anova-Bonferroni); 2) valori di GCS elevati correlano con livelli plasmatici elevati di HCY (in associazione con valori plasmatici di AF bassi) e livelli bassi TAU ($p < 0.01$, Anova-Bonferroni).

Conclusioni. Dal momento che: 1) in fase acuta i CAD presentano livelli plasmatici di TAU inferiori e di HCY superiori rispetto ai SANI e 2) esiste anche una correlazione tra livelli plasmatici ridotti di TAU e gravità di CAD come anche fra livelli aumentati di HCY e gravità di CAD, i dati riportati in questo studio supportano l'ipotesi che l'HCY e la TAU possano svolgere una funzione opposta nella patologia cardiovascolare in accordo con i dati riportati dalla letteratura internazionale.

Bibliografia. Takahashi K., Ohyabu 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.

014

VERSO UNA TERAPIA PERSONALIZZATA NEL TUMORE DELLA MAMMELLA: AMPLIFICAZIONE DEL GENE HER-2/NEU ED ESPRESSIONE DELLA PROTEINA C-ERBB-2

L. Bianchi¹, C. Venturi¹, A. Papucci¹, E. Murabito¹, M. G. Parrillo¹, F. Forese¹, V. Rapicano¹, P. Apicella¹

¹U.O. Anatomia Patologica, Zona Val Di Nievole, ASL3 Pistoia

Numerosi lavori riportano che l'oncogene HER-2/neu, codificante per un recettore transmembrana con attività tirosinchinasica, è importante nella prognosi e nella terapia con Trastuzumab del tumore della mammella (1). Obiettivo. Scopo di questo studio è identificare dei bio-profili utilizzando quattro marcatori molecolari rilevati con tecnica immunoistochimica qualitativa e semi-quantitativa.

Metodi. In 326 casi di neoplasia mammaria è stata analizzata con tecnica immunoistochimica l'espressione recettoriale dei seguenti marcatori biomolecolari: recettore per gli estrogeni (ER), per il progesterone (PGR), indice di proliferazione cellulare (Ki-67)(Ventana) e recettore c-erbB-2(Herceptest, DakoCytomation). Sui casi con espressione del c-erbB-2 quantificata con score 2+ e +3 è stata eseguita la determinazione quantitativa del gene con la tecnica di ibridazione in situ a fluorescenza (FISH, DakoCytomation).

Risultati. I casi sono stati classificati in base all'espressione del recettore c-erbB-2: 1) score 1+ o negativo (186/326); 2) score 2+(90/326); 3) score 3+(50/326). L'amplificazione genica è presente nel 53% dei casi con score 2+ (48/90) e nel 96% dei casi con score 3+(48/50). Tale amplificazione correla in maniera inversa con l'espressione del recettore PGR (che si negativizza quando lo score è >4), in maniera diretta con l'espressione di Ki-67(>20% nei 96 casi con amplificazione genica).

Conclusioni. In base all'amplificazione del gene HER-2/neu si distinguono tre gruppi: 1) assenza, con alti livelli di ER/PGR e basso indice di Ki-67, associata a prognosi migliore e risposta alla terapia ormonale; 2) presenza (score 2-4) con espressione ormonale variabile e Ki-67 intermedio (10-30%). La prognosi è intermedia, la risposta variabile alla terapia ormonale variabile e buona al trattamento con Trastuzumab; 3) presenza (score > 4), PGR negativo, Ki-67 > 30% con prognosi peggiore, non suscettibilità alla terapia ormonale ma a quella con Trastuzumab.

Bibliografia. Ambrogi F., Biganzoli E., Querzoli P., Ferretti S., Boracchi P., Alberti S., Ma Rubini E., Nenci I. Molecular subtyping of breast cancer from traditional tumor marker profiles using parallel clustering methods. *Clinical Cancer Research* Vol. 12, 781-790, February 2006.

015

GSTM1, GSTT1 AND CYP1A1 DETOXIFICATION GENE POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO SMOKING-RELATED CORONARY ARTERY DISEASE

C. Federici¹, S. Manfredi¹, N. Botto¹, I. Sagliano¹, M. G. Andreassi¹

¹Laboratory of Cellular Biology and Genetics, CNR-Institute of Clinical Physiology, G. Pasquinucci Hospital, Massa, Italy

Background. Cigarette smoking is a powerful risk factor for atherosclerosis, but the degree of damage varies from individual to individual. Genetic polymorphisms of relevant xenobiotic metabolising enzymes may determine the susceptibility of an individual response to environmental toxicants.

Aim. To assess whether the inheritance of polymorphic genes encoding cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and glutathione S-transferases (GSTM1 and GSTT1) have an effect in modulating smoking-related coronary artery disease (CAD) risk.

Methods. CYP1A1 (6235T>C) polymorphism and the GSTM1, GSTT1 null genotypes were evaluated by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) in a group of 164 smoker patients (143 male, 57.8Å±10.3 years) consecutively referred to our Department for coronary angiography investigation. Significant CAD was >50 % diameter reduction in at least 1 major coronary vessel.

Results. Significant CAD was detected in 115 patients (70.1%). Gender (p<0.0001), diabetes 2 (p=0.0023), hypertension (p=0.005) and dyslipidemia (p<0.0001) were significant risk factors for CAD development. The frequencies of GSTM1 null genotype (p=0.5) and 6235T>C polymorphism (p=0.13) were not significantly different between patients with or without CAD. The frequency of the GSTT1 null genotype was 42.6% in the CAD patients compared with 24.5% in the no-CAD group (p=0.03). After adjustment for traditional risk factors, the presence of GSTT1 null genotype was significantly associated with an increased risk of CAD (OR=2.6; 95% CI: 1-6.8, p=0.04). Moreover, smokers with the null GSTT1 genotype had a significant increased risk for triple-vessel disease than those with the positive genotype (chi-square=15.5, p=0.002).

Conclusion. Smokers carrying null GST genotype have an increased susceptibility to the smoking related coronary artery disease.

016

EXPRESSION OF BAALC (BRAIN AND ACUTE LEUKEMIA CYTOPLASMIC) GENE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA

S. Calatroni¹, P. Bernasconi¹, B. Rocca¹, M. Boni¹, R. Zappatore¹, I. Giardini¹, P. M. Cavigliano¹, M. Caresana¹, I. Dambrosio¹, C. Astori¹, C. Castagnola¹, M. Lazzarino¹

¹Division of Hematology, IRCCS Policlinico San Matteo, University of Pavia

Clonal chromosome abnormalities play a major role in de novo AML, being absolutely required to make a correct diagnosis and an accurate prognostic stratification. However, about 45% of AML patients are karyotypically normal and are supposed to have an intermediate prognosis, even though only 40% of them are long-term survivors. Therefore, in these patients new molecular markers of prognostic significance have been actively searched and recent evidence suggests that BAALC gene expression levels may be one of the most relevant. The present study was aimed at detecting BAALC expression and at correlating expression levels with clinical/biological parameters and outcome in pre-treatment bone marrow samples of 56 adult AMLs (M0-M1=14, M2=15, M4-M5=26, M6=1), 14 females and 42 males (median age=55 years, range=22-76). BAALC expression was also determined in bone marrow samples of 12 normal controls (6 females and 6 males, median age=44 years, range =28-72). BAALC relative quantification was achieved by real-time PCR using SybrGreen I and a primers pair as already published by Baldus and colleagues (JCO 2006;24:790). PCR efficiency was determined through standard curve analysis of 5 cDNA serial dilutions of a sample exhibiting high BAALC expression. Assay specificity was evaluated through dissociation curves analysis. Quantification was achieved by applying the DDCT method, with ABL as reference gene. Statistical analysis was carried out by applying the Relative Expression SoftwareTool 2005 (Corbett Research; Nucleic Acid Res 2002;30:536).

BAALC expression was low in 24 patients (42.8; mean=0,1474; ds=0,1625; range=0,0021-0,6854) and high in 32 (57,2% mean=6,9907; ds=9,8014; range=0,7474-53,8174), with a statistically significant difference (p=0,001). No statistical differences in expression levels were observed regarding pre-treatment age (<60vs≥60 years), sex, WBC count and percentage of bone marrow blasts. The highest up-regulation of BAALC, in comparison with control samples, was observed in patients AML-M4 with inv(16) (factor 58,5; p=0,001), followed by M0-M1 (factor 18,1; p=0,005), M2 (factor 15,9; p=0,001) and M4 without inv(16) (factor 3,518; p=0,050). No statistical differences were observed between responsive and non responsive patients.

017

PRELIMINARY VERIFICATION OF A QUANTITATIVE TaqMan HEPATITIS C VIRUS-RNA ANALYTE SPECIFIC REAGENT (ASR)

M. Cannone¹, M. Barberis², P. Lucchi³, R. Pulvirenti⁴

¹Lab. Biologia Molecolare, Osp. Multimedica Milano

²Lab. Anatomia Patologica, Osp. Multimedica Milano

³Lab. Biologia Molecolare, Osp. Multimedica Milano

⁴Abbott Diagnostics, Roma

Limitations of current quantitative assays for HCV- RNA include insensitive lower limits of detection and lack of linearity in the upper range. Recently, a new ASR assay based on real-time RT-PCR developed by Celera Diagnostics (Alameda, CA, USA) and marketed in Europe by Abbott Molecular (Chicago, IL, USA), has become available. We compared the Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) with the Celera-Abbott real time PCR, performed on the ABI PRISM 7000 SDS instrument on samples manually extracted by QIAamp viral RNA mini-kit.

Passing-Bablock regression on 38 retrospective samples showed a correlation coefficient R² of 0.905, while the mean Celera- Monitor difference was -0.87 log IU/mL. Accuracy, precision and linearity were verified with an Acrometrix panel (50; 500; 50,000; 500,000;1,000,000 IU/mL), tested in reps of 2 for each level during 4 runs. The total CV (log IU/mL) ranged from 3.9% (1,000,000 IU/mL) to 8,0% (100 IU/mL). Linear regression line between Celera HCV-ASR measured log IU/mL (y) and expected log IU/mL (x) values had the equation: $y=0.996x - 0.366$ (R² =0.9969), while the detection rate at 50 IU/mL was 100% (8/8). The new Celera HCV-RNA ASR assay showed excellent sensitivity, good precision and linearity, and correlated well with the test of reference. Although both assays express results in International Units, they were not interchangeable as a bias was noted, more pronouncedly in patient samples than in the panel. The wider dynamic range coupled with the exquisite sensitivity of the Celera HCV RNA assay allows a relevant gain of reportable results, avoiding reflexing samples to a further dilution step or to a qualitative test.

Reference. Kishimoto H, Yoshioka K, Motoyoshi Y, Ukai K, Ito H, Watanabe K, et al. Real-time detection system for quantitation of hepatitis C virus RNA: a comparison with the other three methods. *Hepatol Res.* 2001;19:12-21.

018

PREVALENCE AND ASSOCIATION OF THE FACTOR V LEIDEN AND PROTHROMBIN G20210A IN HEALTHY SUBJECTS AND PATIENTS WITH VENOUS TROMBOEMBOLISM

A. Caruso¹, C. Scazzone¹, E. Lio¹, S. Cammarieri¹, C. Bellia¹, G. Mingoia¹, M. Ciaccio¹

¹Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction. Several genetics defects of coagulation have been identified as risk factors for venous thrombosis. A single mutation in the factor V gene, the substitution of guanine for adenine at nucleotide 1691 (G1691A), result in a protein called the factor V Leiden which is resistant to degradation by APC, the result is stabilization of the prothrombinase complexes, increased synthesis of thrombin, and hypercoagulability.

Recently another gene mutation associated with thromboembolism has been identified: the substitution of adenine for guanine at nucleotide 20210 of the prothrombin gene (G20210A) is associated with an increased level of plasma prothrombin, which leads to a ipercoagulable state (1).

Materials and Methods. We have examined 73 subjects (age 24-76; ♀=33, ♂=40) affecting by thromboembolic disease and 23 healthy subjects (age 25-65; ♀=13, ♂=10). Total genomic DNA was extracted by salting-out procedure. DNA sample were amplified by a polymerase chain reaction. The detection of the G1691A in the Factor V gene was investigated by the enzyme MnlI. To detect the G20210A mutation, a 506-bp fragment from the 3'- untranslated region of FII gene was amplified by PCR using the mutagenic reverse primer. The nucleotide substitution close to the 3' end of the mutant oligonucleotide, combined with the genetic abnormality (20210 G to A) creates a new restriction enzyme cleavage site, which is recognized by Hind III.

Results and Discussion. Our analysis included 73 patients affected by deep venous thrombosis. Among the patients, 9 (12%) subjects were heterozygotes for G1691A, and 7 (9%) were heterozygotes for PTG20210A; no homozygotes individual was detected. Only one patient was heterozygotes for between mutations. The control subjects were wild- type for G1691A and PTG20210A.

Heterozygous 1691G→A have 5-7 fold increased risk of VTE and Heterozygous 20210G→A have 2.8 fold increased risk of trombosis, than individuals with normal genotype. In conclusion the data presented here indicate that 22% of investigated patients with TVP were carriers of these polymorphisms in contrast the controls were wild-type.

Reference. T. Angelina et al., (2005) *Exp. Mol. Pathol.* 79:9-13.

019

REALIZZAZIONE DI UN NANOCHIP PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI SOGGETTI AFFETTI DA DEGENERAZIONE MACULARE SENILE (AMD)

V. Cetica¹, I. Passerini¹, S. Bernabini¹, A. Sodi², F. Girolami¹, U. Menchini², F. Torricelli¹

¹SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze

²Clinica Oculistica, AOU Careggi, Fiernze

La degenerazione maculare senile (AMD) è una malattia degenerativa che colpisce la macula ed è la principale causa di cecità legale nei pazienti anziani. L'esatta patogenesi della AMD è tuttora sconosciuta; diversi studi indicano un ruolo di fattori genetici. Tra i vari geni candidati il più studiato è certamente il gene ABCR; mutazioni di questo gene sono state descritte in diverse distrofie retiniche autosomiche recessive tra cui la malattia di Stargardt e la AMD.

Lo scopo del lavoro è stato quello di realizzare un microchip mediante tecnologia Nanogen per la detection delle due mutazioni G1961E e D2177N del gene ABCR che risultano frequentemente associate alla AMD.

La tecnologia Nanogen si distingue dalle altre tecnologie microarray per l'impiego del campo elettrico per trasportare il DNA al chip. Il microchip utilizzato presenta 100 siti testo o pad, ognuno dei quali prevede una connessione elettronica individuale. Per ciascuna mutazione di interesse è stato disegnato un opportuno set di sonde rappresentato da due oligonucleotidi reporter: uno specifico per l'allele wild-type e marcato con Cy3, l'altro specifico per l'allele mutato e marcato con Cy5. L'approccio "amplicon down" seguito prevede il trasporto della PCR multiplex su un pad del chip e l'ibridazione passiva con il set di sonde relativo alla prima mutazione di interesse; l'applicazione di opportune stringenze termica e chimica e la rivelazione dei segnali fluorescenti permettono poi l'assegnazione del genotipo a ciascun campione. Dopo la caratterizzazione della prima mutazione, mediante una procedura di "stripping", è possibile eseguire l'ibridazione con il set di sonde relativo alla seconda mutazione in studio.

La validazione della metodica è stata realizzata su 65 pazienti AMD precedentemente caratterizzati mediante metodi "gold-standard", ottenendo una concordanza del 100% indipendentemente dal tipo di mutazione studiata e dal genotipo dei pazienti. Il chip potrà quindi essere impiegato in diagnostica e permetterà di realizzare per i pazienti AMD un grande numero di caratterizzazioni genetiche in tempi brevi.

Bibliografia. "Genetic factors of age-related macular degeneration". Tuo J. et al. Prog Ret and Eye Res 23;(2004):229-249.

020

BIOCHEMICAL MARKERS OF INFLAMMATION, REMODELING AND APOPTOSIS IN AN EX-VIVO MODEL OF HUMAN SAPHENOUS VEIN GRAFT NEOINTIMAL HYPERPLASIA

C. Colotti², M. Maltinti¹, V. Angeli¹, S. Vittorini¹, S. Del Ry¹, D. Giannessi¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology Pisa Italy

²Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

Purpose. Neointimal hyperplasia, the main feature of restenosis after invasive techniques, involves numerous events such as local inflammation, vessel wall remodeling and cellular apoptosis. For this, osteopontin (OPN), interleukin (IL)-6, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9, caspase (CASP)-3 and -9, Bcl-2 and Heat Shock Protein (Hsp)72 were evaluated as a function of the culturing time and intimal thickening in an ex-vivo human model of intimal hyperplasia.

Methods. 10 paired saphenous vein segments were cultured for 10 days in RPMI-1640 with and without 30% (v/v) foetal calf serum (FCS). Biochemical effectors were measured in culture media, at different times during culture, and in tissue, at protein and mRNA level.

Results. An increase of about 40% of the intima thickness was observed after FCS culture with respect to culture with RPMI alone, associated with an enhanced release of OPN, IL-6 and MMPs in the culture media. (OPN: 1.44 ± 0.31 vs. 0.33 ± 0.11 g/mg, $p=0.0032$; IL-6: 39.4 ± 6.2 vs 6.1 ± 1.5 ng/mg, $p<0.001$; MMP-2: 17.3 ± 3.0 vs 11.2 ± 2.7 ng/mg; MMP-9: 0.43 ± 0.01 vs 0.22 ± 0.07 ng/mg, for cultures with and without FCS, respectively, mean \pm sem). Tissue content of OPN, IL-6 and MMPs increased after FCS culture (OPN: 55.2 ± 24.7 ng/mg protein vs 14.9 ± 5.2 for RPMI and 3.8 ± 0.6 before culture, $p=0.025$ vs basal; IL-6: 4.2 ± 0.10 ng/mg protein vs. 0.97 ± 0.30 for RPMI, $p=0.002$, and undetectable before culture). Hsp72 decreased after FCS culture (1.0 ± 0.92 g/mg protein vs 3.1 ± 2.2 for RPMI and 3.5 ± 0.91 before culture, respectively) in parallel with an increase of CASP-3 activity. These findings were confirmed at mRNA level: CASP-3 and -9 mRNA expression were higher after FCS culture (CASP-3 and CASP-9 increased about 6-7 times after FCS vs RPMI culture).

Conclusion. The enhanced OPN, IL-6, MMP production by saphenous vein, associated to lumen reduction, confirms the crucial role of these effectors in vessel remodeling. Moreover, the decreased Hsp72 expression associated with high levels of CASPs indicates that apoptosis may constitute a key process in this situation.

Reference. Mitra AK, et al. Cellular, Molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. Immunol Cell Biol 2006; 84:115-24.

021

A NOVEL DE NOVO MUTATION OF p53 IN A SARDINIAN PATIENT WITH ADRENOGENITAL SYNDROME. PRELIMINARY STUDY OF THE C-TERMINAL DOMAIN OF p53 BY "MOLECULAR MODELLING ANALYSIS"

P. Concolino¹, M. C. De Rosa¹, C. Santonocito¹, S. Rocchetti¹, F. Ameglio¹, F. Vendittelli¹, C. Zuppi¹, B. Giardina¹, E. Capoluongo¹

¹Laboratory of Clinical Molecular Biology, Department of Biochemistry & Clinical Biochemistry, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

Aim. A novel p53 point mutation, characterized by a substitution of G with E aminoacid in position 389, has been found in a Sardinian woman (proband) affected with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia (SV-CAH), confirmed by high 17OH-progesteron and homozygosity for I172N CYP21b mutation (a marker of 21-hydroxylase deficiency). The family of this woman included other two subjects with SV-CAH, also affected by different types of cancer. This was the principal reason for a p53 screening that lead to the discovery of the above mentioned mutation only in the blood of the proband.

Materials and Methods. Nine members of a Sardinian family were enrolled for CYP21b and p53 genetic analysis, by means of PCR amplification and subsequent DNA sequencing. Also the RNA of the mutated subject was analysed by means of RT-PCR and subsequent cDNA sequencing. In addition, a molecular modelling study was performed by the insight MODELER program.

Results. A novel mutation, named G389E, was found only in a member of this family. This mutation did not affect mRNA and consequently the retrotranscribed cDNA was normal. In addition, the molecular modelling showed that the G389E mutation significantly modified the protein conformation therefore affecting the phosphorylation pattern at the C-terminal domain.

Conclusions. Our data indicate that this mutation is a novel "de novo" mutation which might strongly affect the phosphorylation pattern of the p53 protein. Further studies have been planned to evaluate if this novel de novo mutation might represent only a rare polymorphism.

Reference. Concolino P, Capoluongo E, et al. Linkage between I172N mutation, a marker of 21-hydroxylase deficiency, and a single nucleotide polymorphism in Int6 of CYP21B gene: A genetic study of Sardinian family. Clin Chim Acta. 2006;364(1-2):298-302.

022

INTERAZIONE TRA GENI NELLO SVILUPPO DEL FENOTIPO DELL'EMOFILIA A

V. D'Argenio¹, P. Nardiello¹, F. Zarrilli², G. Castaldo², A. Rocino³, A. Coppola⁴, G. Di Minno⁴, F. Salvatore¹

¹Dip. di Biochimica e Biotechnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II" e CEINGE-Biotechnologie Avanzate, Napoli

²Facoltà di Scienze, Università del Molise, Isernia

³Centro Emofilia e Trombosi, Osp. S. G. Bosco, Napoli

⁴Centro di Coordinamento Regionale Emocoagulopatie, Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Napoli "Federico II", Napoli

L'emofilia A è una coagulopatia ereditaria a trasmissione recessiva legata al cromosoma X, dovuta alla carente attività del fattore VIII (FVIII) della coagulazione. In base all'attività residua di FVIII, si distinguono tre forme cliniche di emofilia: lieve, moderata e severa. Sono stati descritti pazienti che, pur avendo mutazioni causative di tipo severo, presentano un quadro clinico lieve. Si è, pertanto, ipotizzato che il fenotipo dell'emofilia risulti non solo dalla mutazione nel gene del FVIII, ma anche da mutazioni a carico di altri geni che, ereditati in maniera indipendente, possano agire da "geni modulatori". I fattori di rischio genetico associati a trombofilia, essendo varianti polimorfiche estremamente diffuse nella popolazione generale e sbilanciando in senso procoagulante il sistema emocoagulativo, potrebbero essere candidati per questo ruolo. Scopo di questo studio è stato quello di valutare, in una coorte di 60 pazienti con emofilia severa, l'esistenza di una correlazione tra la presenza di varianti geniche associate a trombofilia ed il quadro clinico emofilico. L'analisi dei polimorfismi genici associati a trombofilia è stata eseguita mediante la tecnica del reverse dot-blot di prodotti di amplificazione ottenuti tramite multiplex-PCR; il saggio permette lo studio contemporaneo dei principali fattori di rischio trombotico: FV Leiden, FVR2, protrombina, FXIII, beta-fibrinogeno, PAI-1, HPA, MTHFR C677T ed MTHFR A1298C. Sono stati, quindi, selezionati alcuni parametri clinici, indicatori della severità dell'espressione clinica dell'emofilia (quantità di fattore carente somministrato annualmente, numero di episodi di emorragia e di emorragia intraarticolare, numero di interventi chirurgici correttivi).

Abbiamo, quindi, confrontato i risultati dell'analisi molecolare di rischio trombotico con i valori dei suddetti parametri per ciascuno dei pazienti. L'analisi preliminare dei dati indica l'assenza di una correlazione statisticamente significativa tra le varianti geniche di trombofilia ed il fenotipo emofilico.

Il lavoro è supportato da contributi della Regione Campania (L. 502/92, annualità 2002) e dell'Università del Molise.

023

ANALISI DELLE PROTEINE PLASMATICHE NELLA POPOLAZIONE SARDA

M. A. Cuccuru¹, F. Carta², L. Musino¹, C. Carru¹, R. Rossi¹, P. Maieli¹, F. Turrini², L. Deiana¹

¹Dip. Scienze Biomediche -Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università di Sassari

²Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Sezione di Biochimica, Università di Torino

L'invecchiamento è un processo estremamente complesso che interessa i diversi tessuti dell'organismo. Sebbene la sempre maggiore disponibilità di informazioni riguardo al genoma umano consentano ormai di poter sequenziare e studiare un gran numero di geni, si conosce ancora poco circa il ruolo biologico di molti di essi, anche se identificati all'intero genoma, ed ancora più oscuro appare il riconoscimento dei prodotti funzionali da loro codificati. In questo contesto, l'utilizzo della elettroforesi bidimensionale e della spettrometria di massa per l'analisi delle proteine plasmatiche, può fornire grandissime potenzialità. In questo studio sono stati presi in considerazione 129 campioni plasmatici prelevati da soggetti sardi di età compresa fra i 60 e i 105 anni. Le proteine presenti nei singoli campioni plasmatici sono state separate mediante elettroforesi bidimensionale (1). Successivamente i gels analitici sono stati analizzati qualitativamente e quantitativamente con il software PD-Quest e gli spots proteici di interesse sono stati staccati dai gels preparativi ed identificati mediante MALDI-TOF e/o Q-TOF. I risultati ottenuti in questo lavoro evidenziano importanti variazioni quantitative per le proteine corrispondenti a diversi spots proteici. Fra queste possiamo ricordare le seguenti proteine: Serum amyloid A protein, GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose Epimerase/Reductase, alpha-1-antitrypsin, Histidine-rich glycoprotein, Transthyretin, Apolipoprotein, Haptoglobin. Questo lavoro, sebbene ancora incompleto, fornisce le basi razionali per ulteriori studi circa le possibili interazioni e/o reciproche regolazioni esistenti tra le diverse molecole proteiche durante l'invecchiamento.

Bibliografia. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al., The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* 21;1037-1053:2000.

024

ANALISI GENETICA DELLA VARIANTE PON1Gln/Arg 192 SU UN CAMPIONE ANZIANO DELLA POPOLAZIONE SARDA

L. Musino¹, R. Rossi¹, A. Bacciu¹, M. E. Sini¹, C. Carru¹, C. Franceschi², L. Deiana¹

¹Dip. Scienze Biomediche -Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università di Sassari

²Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Bologna

I centenari rappresentano un esempio unico di invecchiamento con successo e forniscono un modello ideale per la ricerca dei fattori che preservano dai processi ossidativi. La paraoxonasi-1 umana (PON1), una idrolasi sierica legata alle HDL, protegge le LDL dalle modificazioni ossidative. La sua attività è regolata da fattori genetico-ambientali e sembra variare ampiamente tra individui e popolazioni. In questo studio abbiamo testato l'ipotesi che il polimorfismo Gln/Arg 192 della PON1 influenzi la sopravvivenza a lungo termine e abbiamo valutato la sua correlazione con l'età. Poiché la variante sembra modulare le concentrazioni dei lipidi plasmatici abbiamo confrontato i livelli del colesterolo HDL e LDL con la variabilità genetica della PON1. I partecipanti allo studio sono stati reclutati nell'ambito dello studio sardo caso-controllo AKeA. Il campione (N=474) era così costituito: 114 controlli (età media 60,5±1,26), 120 ottantenni (età media 80,5±1,29), 120 novantenni (età media 90,2±1) e 120 centenari (età media 101±1,59). L'identificazione genotipica è stata effettuata mediante PCR-RFLP (1). I livelli del colesterolo HDL e LDL sono stati dosati con metodi standard. Le distribuzioni genotipiche ed alleliche sono state comparate con il test del chi quadrato. La correlazione genotipo-livelli lipidici è stata valutata mediante il test ANOVA. L'analisi del locus Gln/Arg 192 non ha evidenziato differenze significative in relazione all'età né alcuna associazione con i livelli del colesterolo HDL o LDL (P>0,05). Le frequenze genotipiche e alleliche erano comparabili nelle quattro classi di età ed in particolare il genotipo omozigote Arg/Arg era assente nei centenari maschi. Diversamente da quanto riportato da altri autori i nostri risultati sembrano suggerire che la variante PON1-192 non è correlata con la longevità nella popolazione sarda. Tale discrepanza potrebbe essere determinata dalle differenti caratteristiche genetiche delle popolazioni esaminate e dalla diversa ampiezza ed età dei controlli reclutati. In conclusione le nostre osservazioni richiedono conferme in ulteriori analisi su un campione più ampio allo scopo di poter apprezzare anche eventuali differenze tra i sessi.

Bibliografia. Humbert et al., *Nat. Genet.*, 3:73-76;1993

025

CARENZA DI G6PD-563 MED IN UN GRUPPO DI SOGGETTI ULTRASESSANTENNI DELLA SARDEGNA

F. Serralutzu¹, A. Bacciu¹, P. Occhineri¹, G. M. Pes¹, R. Rossi¹, C. Franceschi², C. Carru¹, L. Deiana¹

¹Dip. Scienze Biomediche -Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università di Sassari

²Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università Bologna

Introudzione. La carenza di G6PD è uno dei difetti genetici meglio conosciuti. Esiste una stretta correlazione tra deficit di G6PD e la malaria: le mutazioni in eterozigosi, conferiscono un vantaggio selettivo nei confronti dell'infezione, che ha determinato elevate frequenze in regioni malariche o ex malariche. L'osservazione ha condotto all'ipotesi che la mancanza di G6PD conferisca un rischio ridotto nell'infezione del Plasmodium. Esistono circa 130 mutazioni. In Italia le varianti più comuni sono: la Mediterranea (>70%), Union e Seattle (6%), A- (4%), S.Antioco e Cosenza (1,2%). Il nostro studio riguarda principalmente la variante Mediterranea per l'elevata incidenza in Sardegna.

Materiale e Metodi. La G6PD Med presenta una mutazione a livello dell'esone 6 in posizione 563 con la sostituzione di una citosina con una timina, responsabile della deficienza enzimatica. Sono stati utilizzati i seguenti primer (5'-GGTGAGGCTCCTGAGTACCA-3' e 5'-AGCTGTGATCCTCACTCCCC-3'). L'enzima di restrizione utilizzato è l'Mbo II che digerisce l'amplificato mutato in 2 frammenti di 138 bp e 116 bp. Sono stati esaminati 351 soggetti di cui 128 maschi e 223 femmine Sardi. L'amplificato è poi digerito overnight con 2.5 U di MboII, a 37°C. L'enzima di restrizione riconosce e taglia il sito mutato CT al nucleotide 563 (G6PD Med).

Risultati. La frequenza della mutazione G6PD med, esaminata in 351 soggetti della popolazione Sarda, è pari a 11,7% in totale. Le percentuali più rappresentative per categoria di età sono: 14,3% delle femmine portatrici nella classe dei sessantenni; 1,9% delle femmine omozigoti per la mutazione fra i centenari e 3,7% fra i maschi centenari. E' stata calcolata inoltre, la percentuale di soggetti G6PD carenti, rilevata con le analisi di laboratorio (attività enzimatica) che includono tutte le mutazioni presenti nella popolazione. Si osserva ovviamente una frequenza più bassa di G6PD med rispetto al totale. Concludendo una buona frazione di G6PD carenti sardi è rappresentata da altre mutazioni.

Bigliografia. Deiana L., Pes G.M., Carru C. et al. B-thalassemia trait and G6PD deficiency are associated with increased longevity in Sardinia. Clin. Chem. 46, A210

026

CHROMOSOME Y HINDIII POLYMORPHISM FREQUENCY IN OLDER SARDINIAN ADULTS

R. Rossi¹, L. Musino¹, F. Serralutzu¹, G. M. Pes¹, P. Maieli¹, M. A. Cuccuru¹, C. Carru¹, L. Deiana¹

¹Dip. Scienze Biomediche -Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università di Sassari

Throughout most of life, males have higher average blood pressures than females. This sexual dichotomy may be related to genetic factors including the X and Y chromosomes and genes that control sex steroids. Resultant physiological differences between men and woman may also be relevant to the quantitative variation of blood pressure (BP) within the sexes. In males, the Y chromosome exists as a single chromosome and does not recombine for 95% of its length (non-recombining region). With the exception of two small recombining pseudoautosomal regions (PAR1 and PAR2), the Y chromosome is inherited intact from father to son. In humans, the finding that the BP of normotensive male offspring is influenced by a hypertensive father but not a hypertensive mother provides indirect evidence of a relationship between the Y chromosome and hypertension. Direct evidence of this relationship includes the association of BP with the HindIII centromeric aliphoid satellite polymorphism, a SNP located in the non-recombining region of the Y chromosome in different populations.

We evaluated the association between the HindIII polymorphism and blood pressure in a old Sardinian people.

For this study, a total of 159 Sardinian older individuals were enrolled without regard to blood pressure. Subjects were aged between 60 and 108 (mean age 88,01 14,06). Three measurements of systolic and diastolic blood pressure were taken in sitting position using a mercury sphygmomanometer. The HindIII polymorphism was detected by PCR amplification and the fragment of 285 bp was digested with HindIII restriction enzyme. The presence of the restriction site (which we designate the A genotype) is indicated by 3 fragment bands of 285, 250, and 35-bp, whereas the absence of the restriction site (which we designate the B genotype) is indicated by a single 285-bp band.

The AA genotype, was found in 120 participants (75,5%), BB genotype in 39 subjects. No significant differences in SBP or DBP were observed between genotypes analyzed.

In this study, we have found no association between HindIII polymorphism and blood pressure in our Sardinians population group. Further studies on a larger sample are needed to detect the possible association between this SNP and blood pressure in the ageing process.

027

INCIDENZA DI Q39X IN UNA POPOLAZIONE DI ANZIANI DELLA SARDEGNA

A. Bacciu¹, P. Occhineri¹, F. Serralutzu¹, L. Musino¹, P. Manchia¹, G. M. Pes¹, G. Baggio², C. Carru¹, L. Deiana¹
¹Dip. Scienze Biomediche -Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università di Sassari
²Azienda Ospedaliera - Università di Padova

Introduzione. La beta talassemia è una patologia ematologica ereditaria. Si tratta di una malattia autosomica recessiva causata dalla mutazione nel gene B globinico. Tale gene codifica la maggior parte delle proteine che compongono l'emoglobina A. Queste mutazioni coinvolgono generalmente la sostituzione, l'inserzione o la delezione del normale gene β globinico. La β talassemia è diffusa principalmente nel Mediterraneo, nell'Asia sud orientale e nella popolazione africana. Si manifesta solitamente negli omozigoti con una grave anemia emolitica trasfusione dipendente (morbo di Cooley). Sono state caratterizzate più di 120 mutazioni del gene β -globinico. La mutazione non senso del codone 39 è predominante in tutte le regioni del Mediterraneo ed è causa di β talassemia, presente con una frequenza pari al 95% nella popolazione Sarda.

Materiali e Metodi. L'amplificazione determina la creazione di un frammento lungo 201 bp. L'amplificato mutato è tagliato in due frammenti di 178 bp e 23 bp dall'enzima di restrizione XbaI. Sono stati esaminati 452 soggetti sardi, appartenenti al progetto AKeA. L'amplificazione è stata realizzata con 5 μ l DNA in 25 μ l di soluzione contenente: 10mM Tris-HCl a pH 8.3; 500mM KCl; 1.1 mM MgCl₂ 0,1% gelatina; 200 μ M di dNTPs e 1 unità di REDTaq DNA polymerase (Sigma); 2.5nM dei due primer (5'-CTGCTGGTGGTCTACCCCTGGATC-3' sense e 5'-CTTGTCACAGTGCAGCTCAC-3' antisense). I frammenti amplificati sono digeriti overnight con 5 U di XbaI, a 37°C e di seguito analizzati con un gel al 2.5% di MetaPhor agarose (Cambrex) in bromuro di etidio.

Risultati. La percentuale più alta di Q39X è stata osservata nella popolazione dei novantenni (19,4%) mentre la percentuale più bassa (8,82%) è stata riscontrata tra i centenari. Tuttavia i dati sopra riportati rappresentano uno studio preliminare che non consente di fare ipotesi concrete sulla possibile correlazione fra longevità e la mutazione Q39X, perciò solo dopo aver completato tutte le indagini, sarà possibile accertare un eventuale coinvolgimento di tale mutazione con l'invecchiamento della popolazione sarda.

Bigliografia. L. Deiana, G.M. Pes, C. Carru et al. β -thalassemia and G6PD deficiency are associated with increased longevity in Sardinia. Clin. Chem. 46(6), A210.

028

SEQUENCING AND CARDIAC EXPRESSION OF NATRIURETIC PEPTIDE RECEPTOR 2 (NPR-B) IN SUS SCROFA AND ITS HOMOLOGY WITH MOUSE

S. Del Ry¹, M. Cabiati¹, M. Colotti¹, M. Maltinti¹, V. Lionetti², M. Emdin¹, F. Recchia², D. Giannessi¹
¹CNR Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy
²Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

Background. C-type natriuretic peptide (CNP), a member of the family of natriuretic peptides, is found not only in the heart, but that it is also elevated during heart failure (HF) where it may elicit important compensatory physiological consequences on ventricular remodeling. The cardiovascular actions of CNP are mediated mainly via interaction with natriuretic peptide receptor-B (NPR-B), whose pathophysiological role on the cardiovascular function is not yet completely determined.

Aim. In the context of a wide study devoted to assess the possible role and function of CNP and its main receptor NPR-B, in a pig experimental model of pacing induced HF, we sequenced and determined the cardiac expression of NPR-B in Sus Scrofa, lacking in GenBank, and evaluated its homology with murine and human species.

Method. Total RNA was extracted from samples obtained from mouse heart and from atrium and ventricle of normal and HF pig by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. Polymerase chain reaction primers designed from consensus sequences of mouse were used to sequence the pig NPR-B gene and the bands of interest were excised from the gel and processed with a Gel extraction kit protocol. The purified DNA was electrophoresed on agarose gels together with a known concentration DNA marker and the bands were analyzed by Quantity One Software. The DNA was sequenced with Sanger method using Applied Biosystems ABI PRISM 3730 XL DNA Sequencer (BMR, CRIBI-Padova University). All sequences were analyzed using BLAST and FASTA against GenBank database to determinate sequence identity.

Results. Bands obtained with pig cardiac tissue shared a 93% sequence homology with a region of mouse NPR-B and 95% with Homo Sapiens. Sus scrofa natriuretic peptide receptor 2 mRNA, 1-396 pb, was submitted to GenBank (accession number DQ487044) and made available to all researchers that study this widely used animal model. The knowledge of the NPR-B sequence may help in the evaluation of the alteration of the expression of this receptor in different diseases, suggesting potential ways for therapeutic intervention.

Reference. Stepan H, Leitner E, Bader M, et al. Organ specific mRNA distribution of CNP in neonatal and adult mice. Regulatory Peptides 2000;95:81-5.

029

IL POLIMORFISMO DEL GENE MMP3 ASSOCIATO AD AUMENTATA MORTALITÀ

M. Erario¹, F. Pateri¹, L. Ferri¹, L. Bava¹, M. Cozzolino¹, G. Melzi d'Eril², M. L. Biondi¹

¹Laboratorio Chimica Clinica e Microbiologia, Az Ospedaliera San Paolo, Milano

²Dip Med, Chir e Odont, Università degli Studi di Milano,

Attualmente l'elevata mortalità e morbilità cardiovascolare del paziente emodializzato suggerisce la valutazione oltre ai normali fattori di rischio (diabete, ipertensione, età, fumo) anche la considerazione di fattori non tradizionali ma di rilevante interesse eziopatogenetico e prognostico significativo come lo stress ossidativo, l'alterazione del metabolismo calcio-fosforo, l'infiammazione cronica e la aumentata calcificazione vascolare. Quest'ultima sembrerebbe accelerare il processo aterosclerotico.

Le Metalloproteinasi (MMPs) appartengono ad una famiglia di enzimi che rivestono un ruolo importante nel processo di rimodellamento della matrice extracellulare e quindi coinvolte nell'eziologia aterosclerotica e in particolare nell'evoluzione della placca.

In particolare MMP3 sembrerebbe avere un ruolo rilevante nel favorire la calcificazione vascolare.

Recentemente il polimorfismo sul promotore del gene MMP3 (5A/6A) è stato relazionata con un incremento delle calcificazioni delle arterie coronarie (Pollanen PJ et al, *Atherosclerosis* 2002, 164:329-335).

Nel nostro studio per valutare l'influenza del polimorfismo sulla componente fibrotica abbiamo correlato i nostri dati su uno studio di 99 pazienti dializzati e 133 pazienti di controllo

Il polimorfismo è stato determinato mediante PCR e sequenziamento diretto. La frequenza all'elica nei pazienti e nel gruppo controllo è paragonabile (5A/5A 36 vs 18; 5A/6A 59 vs 60; 6A/6A 38 vs 21; controls vs patients). Significativa è la distribuzione legata alla mortalità; infatti i pazienti deceduti per cause cardiovascolari presentano un significativo aumento del genotipo 6A/6A (OR 3.77; 95% CI 1.23-12.3; p=0.0081) al confronto dei pazienti ancora in vita.

Il nostro studio suggerisce che la presenza dell'allele 6A costituisce un fattore prognostico negativo per la sopravvivenza dei pazienti sottoposti ad emodialisi.

030

GENE POLYMORPHISM AND SERUM FETUIN-A (AHSG) IN HAEMODIALYSIS (HD) PATIENTS

M. Erario¹, L. Ferri¹, L. Bava¹, F. Pateri¹, M. Cozzolino¹, G. Melzi d'Eril², M. L. Biondi¹

¹Laboratorio Chimica Clinica e Microbiologia, Az Ospedaliera San Paolo, Milano

²Dip Med, Chir e Odont, Università degli Studi di Milano

Introduction and Aims. Vascular calcification (VC) and accelerated atherosclerosis are major causes of cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis (HD) patients. Protective proteins associated with reduced vascular calcification may play a key role in preventing VC in renal failure. Fetuin-A is a circulating inhibitor of VC that has been associated with inflammation and cardiovascular mortality in HD patients. In the present study we investigated the associations between serum fetuin-A levels and its gene (AHSG) polymorphisms in a HD population.

Methods. 96 patients on stable chronic HD treatment and 57 healthy controls were genotyped for the common polymorphisms on the AHSG (T256S). In addition, serum fetuin-A levels were tested by using an ELISA Kit (Epitope Diagnostics, Inc, San Diego, USA).

Results. In this study serum fetuin-A levels are lower in HD patients (0.35 ± 0.11 g/L) compared to healthy controls (0.62 ± 0.31 g/L, p<0.05). In both HD and control group, the distribution of the AHSG gene did not show significant association between low serum fetuin-A levels and the Ser/Ser genotype, known to be associated with a higher cardiovascular mortality risk in HD population (Stevinkel P et al, *Kidney Int* 2005; 67: 2383-2392). Moreover, the distribution of AHSG gene polymorphisms in HD patients and in healthy controls is similar (Thr/Thr 31; Thr/Ser 23, Ser/Ser 3 (Controls); Thr/Thr 59; Thr/Ser 31; Ser/Ser 6 (HD))

Conclusions. This study suggests that patients with chronic renal failure in HD treatment have a similar polymorphism distribution of AHSG gene compared to normal population and that the reduction of serum fetuin-A levels in HD patients is not associated to alteration on the distribution of AHSG T256S polymorphisms.

031

DECREASED SERUM FETUIN-A LEVELS AFTER A SINGLE HAEMODIALYSIS SECTION

L. Ferri¹, L. Bava¹, F. Pateri¹, M. Erario¹, M. Cozzolino¹, G. Melzi d'Eril², M. L. Biondi¹

¹Laboratorio Chimica Clinica e Microbiologia, Az Ospedaliera San Paolo, Milano *

²Dip Med, Chir e Odont, Università degli Studi di Milano

Background. The prevalence of chronic inflammation is a major problem in haemodialysis (HD) patients. Moreover, inflammation and cardiovascular calcification are associated with higher risk of cardiovascular mortality in this population. Recently, it has been investigated the role of fetuin-A (AHSG, alpha 2-Heremans-Schimid glycoprotein), as an important inhibitor of extraskelatal calcifications, associated with inflammation and increased cardiovascular mortality in HD. In this study we examined the effects of a single haemodialysis section on serum fetuin-A levels and other markers of inflammation, such as C reactive protein (CRP) and fibrinogen.

Methods. We evaluated 20 patients clinically stable (40% males), aged 67±12.8 years with a dialysis vintage greater than 9 months, 50% in standard bicarbonate-haemodialysis and 50% in haemodiafiltration. Serum levels of fetuin-A, CRP, and fibrinogen were measured at the beginning and at the end of a four hours haemodialysis section. In addition, serum fetuin-A levels were tested by using an ELISA Kit (Epitope Diagnostics, Inc, San Diego, USA).

Results. We showed that serum CRP and fibrinogen levels did not change during the single dialysis section (CRP 9.5±1.3 vs 8.9±1.2 mg/dl; Fibrinogen 351 ±/ 87 vs 415 ±/ 93 mg/dl). In contrast, serum fetuin-A levels decreased significantly after the 4 hours of HD (0.26±/0.06 vs 0.21 ±/ 0.06 gr/L; p=0.027). We did not observe significant differences of serum fetuin-A levels between patients treated with standard bicarbonate-haemodialysis and haemodiafiltration.

Conclusion. Chronic inflammation is one of the most important non traditional cardiovascular risk factors associated with vascular calcification in HD patients. The present study confirms that HD patients have reduced serum fetuin-A levels compared to normal population (vn=0.5-1.0 g/L). Furthermore, serum levels of fetuin-A decreased during a single haemodialysis section.

032

SCREENING OF CARDIAC ION CHANNEL GENES REVEALED SEVEN MUTATIONS (INCLUDING THREE NEW MUTATIONS) IN ELEVEN FAMILIES AFFECTED BY LONG-QT SYNDROME

G. Frisso¹, E. Evangelista¹, C. Cozzolino¹, B. Sarubbi², R. Calabrò², F. Salvatore¹

¹Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, Naples University Federico II, and CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy

²U.O.C. Cardiologia, A.O. Monaldi, Second University of Naples, Italy

Objectives. To determine the spectrum of cardiac channel mutations in a cohort of unrelated patients referred as affected by long-QT syndrome (LQTS).

Background and Methods. Congenital LQTS is a cardiac channelopathy caused by mutations in the KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1 and KCNE2 genes that encode cardiac ion channel subunits.

We screened for LQTS-causing mutations in the KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1 and KCNE2 genes 11 unrelated patients using the polymerase chain reaction, denaturing high-performance liquid chromatography and DNA sequencing. We then expressed the unknown mutant c.4414_{}4416delAAC Na-channel cDNA by mutagenesis of the hH1 SCN5A clone (genBank M77235) in a pRc/CMV plasmid and transfected it in HEK 293 cells. The fluorescein-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody was used to locate the mutant Na-channel and was applied to transfected cells after incubation with rabbit anti-SCN5A IgG.

Results. We found 7 disease-causing mutations in the 11 unrelated LQTS families (64%): c.G5350A in SCN5A, c.C1682T in KCNH2, and c.G1573A and c.G1748A in KCNQ1, which are known mutations, and c.4414_{}4416delAAC and c.C3989A in SCN5A, and c.1450_{}1467del in KCNH2, which are novel mutations. All mutations co-segregated with the disease in the affected families, except in a child who had no disease signs or symptoms, despite being a carrier of a disease-causing SCN5A gene mutation. Immunocytochemistry showed that the c.4414_{}4416delAAC SCN5A variant is located to the cell surface, as expected for a normally trafficking channel. Functional characterization of this variant and of the other unknown mutations are in progress by voltage-clamp technique.

Conclusions. About 65% of our patients had a mutation: half of the mutations are new. Screening of cardiac ion channel genes may: i) facilitate causative analysis at gene level in LQTS patients, and ii) identify carriers of gene mutations with reduced penetrance, thereby reducing the risk of sudden death.

Acknowledgments. This work was supported by grant from Regione Campania (Convenzione CEINGE-Regione Campania, G.R. 27/12/2002 N. 6276).

References. Viswanathan PC, Balser JR. Inherited sodium channelopathies Trends in Cardiovascular Medicine 2004;14:28-35

033

CARATTERIZZAZIONE DI 27 NUOVE MUTAZIONI NEL GENE DEL FVIII

S. Frusconi¹, B. Minuti¹, C. Romolini¹, A. Mariottini¹, S. Linari², M. Morfini², F. Torricelli¹

¹SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze

²Agenzia per l'emofilia, AOU Careggi, Firenze

L'emofilia A è un disordine emorragico recessivo X-linked causato dalla carenza del FVIII della coagulazione.

Il gene è localizzato sul cromosoma X, in posizione Xq28 e comprende 26 esoni.

Difetti molecolari diversi a livello del gene del FVIII provocano alterazioni quantitative e/o qualitative della proteina. Per le grandi dimensioni e l'alta frequenza di mutazioni de-novo del gene del FVIII, la caratterizzazione molecolare può presentarsi difficile.

L'inversione dell'introne 22 è la mutazione più frequente e si riscontra in circa il 40% dei casi con forma severa. L'inversione dell'introne 1 si riscontra invece nel 5% dei pazienti affetti dalla forma severa. Nel 30% circa delle famiglie del Nord Italia affette da emofilia A lieve, è stata inoltre descritta la duplicazione dell'esone 13.

Escludendo le due inversioni e la duplicazione dell'esone 13, l'emofilia A è causata da un insieme eterogeneo di mutazioni: ad oggi ne sono state descritte oltre 1000.

Dal 1999, presso la nostra SOD, sono afferiti 307 campioni suddivisi in 180 pazienti e 127 femmine a rischio.

Il protocollo molecolare utilizzato è stato il seguente:

- 1) Estrazione del DNA
 - 2) Ricerca della inversione dell'introne 22
 - 3) Ricerca dell'inversione dell'introne 1
 - 4) Ricerca della duplicazione dell'esone 13
 - 5) Screening di mutazioni mediante DHPLC
 - 6) Sequenziamento dei campioni positivi allo screening
- Mediante diagnosi diretta sono stati caratterizzati 141/180 pazienti; sono state inoltre identificate 66 portatrici e questo, a sua volta, ci ha consentito di eseguire 10 diagnosi prenatali. L'inversione dell'introne 22 è stata riscontrata in 45/180 pazienti, l'inversione dell'introne 1 in 1/180 e la duplicazione dell'esone 13 in 1/180. Delezioni, inserzioni, mutazioni di splicing, mutazioni non sense e missense sono state caratterizzate in 94/180 pazienti. Tra queste, 27 mutazioni non sono descritte in letteratura. La caratterizzazione molecolare dei pazienti affetti da Emofilia A rappresenta il primo step per la comprensione dei meccanismi eziopatogenetici alla base della malattia e per la correlazione genotipo-fenotipo.

Bibliografia. Oldenburg J, et al. New insight into the molecular basis of hemophilia. *A. Int J Hem.* 2006;83:96-102.

034

A GENERAL GENE EXPRESSION ANALYSIS IN DUODENAL BIOPSIES OF CELIAC DISEASE PAEDIATRIC PATIENTS WITH cDNA MICROARRAYS

G. Gerosolimo¹, P. Tataseo¹, A. R. Ciccaglione², C. Marcantonio², L. Geraci¹, F. Bascietto³

¹Transfusion Medicine, Laboratory of Molecular Biology, ASL 01, Sulmona, Italy

²Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

³Paediatric Unit, ASL 01, Sulmona, Italy

Background and Aims. Celiac Disease (CD) is a multifactorial disease where gluten intake together with a multigenic assect, with HLA DQ2 and DQ8 genes playing a dominant role to antigen presentation and to bias Th response, can induce the immunological attack to duodenal mucose. There are also other genes, not yet completely individuated, involved in the pathogenesis of CD, genes that control the immune response, so that the molecular pathway that lead to CD is still poorly understood.

With the aim of do more light in the molecular aspects of CD pathogenesis we used the cDNA microarray technology to investigate the general gene expression profile of duodenal biopsies.

Methods. We used cDNA microarray representing 27.868 human genes to analyze 8 biopsies from paediatric patients with celiac disease (4 with Marsh III and 4 with Marsh II classification) compared with 4 normal biopsies. We obtained total RNA from all the biopsies and assessed quality and quantity. Then we converted the mRNA into labeled cRNA with RT-IVT method and put into the array for hybridization. Then we read the chemiluminescent signal of each probe in AB1700 analyzer and normalized data with the quintile method, and we analyzed the probes with $p < 0.05$ with panther gene for biological process.

Results. We observed that the categories more represented in the up-regulated genes were: immunity and defense, B-cell and antibody mediated immunity, mesoderm development, cytokine and chemokine mediated signalling pathway, hematopoiesis and chromosome segregation. In down-regulated genes were overrepresented the categories of electron transport and carbohydrate and lipid methabolism.

Conclusions and Perspectives. In this preliminary study we observed that the biopsies of celiac paediatric patients shows an activation of a number of genes involved in the immune response, especially the Th1 pathway, and cell differentiation. At this study will follow other microarray assays also in biopsies of individual with normal duodenal histology but with genetic predisposition to CD (HLA-DQ2) and positivity to anti-tTG, with the aim of individuate possible genetic markers involved in early pathogenesis of CD, followed by a validation of the array data with Real-Time PCR.

035

EXPLORATION OF GENERAL GENE EXPRESSION IN HCV REPLICON CELL LINES

A. R. Ciccaglione¹, G. Gerosolimo², C. Marcantonio¹, P. Tataseo², Y. D'Alesio², L. Geraci²

¹*Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

²*Transfusion Medicine, Laboratory of Molecular Biology, ASL 01, Sulmona, Italy*

Introduction. Infection with Hepatitis C Virus (HCV) represents the major cause of liver disease, affecting more than 170 million individuals worldwide. Persistent HCV infection often leads to a risk of end-stage cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Several data indicate that HCV replication can influence the progression and the severity of liver diseases by modulation of gene expression.

Methods. To evaluate HCV-induced modifications in the global expression profile, we compared gene expression of the human hepatoma cell line 21-5 carrying the HCV replicon with the parental cell line Huh7. Gene expression was examined using Applied Biosystems Human Genome Survey Microarrays with RT-IVT chemistry and using the scanner AB1700 for reading arrays. The study was designed to analyze gene expression for two biological replicates for each cell lines, for a total of 4 microarrays. We normalize the data with the quintile method; and analyzed the resulting differentially expressed genes ($p < 0.05$) with panther.

Results. Data obtained from this study demonstrates that HCV differentially affected genes that are involved in important biological process and molecular functions, such as oxidoreductase, protein methabolism and modification, cell cycle, apoptosis, immunity and defense. Modulation of specific genes by HCV was confirmed by Real Time PCR.

Conclusions. In conclusion the analysis of gene expression profile in cells carrying the full-length HCV replicon shows that viral replication results in a specific and significant alteration of genes involved in cellular processes wich are relevant for HCV pathogenesis.

036

QUANTITATIVE FLUORESCENCE POLYMERASE CHAIN REACTION (QF PCR) IS ABLE TO DETECT SEX CHROMOSOME ANEUPLOIDIES: A REPORT OF A RARE CASE OF MALE 48, XXYY

D. Giambelluca¹, L. Indaco¹, A. Lama¹, M. Maniscalco¹, A. Volpes¹, A. Allegra¹

¹*Andros Day Surgery, Palermo*

Introduction. QF PCR performs rapid prenatal diagnosis of aneuploidies involving 13, 18, 21, X and Y chromosomes. It is based on the PCR amplification of specific Short Tandem Repeats (STR) located on both arms of chromosomes. With regard to chromosomes X and Y, recent studies identified five different STR markers mapped on X chromosome; two of them are also present on Y chromosome. QF PCR using these five STR markers allows us to rapidly identify the most common aneuploidies involving sex chromosomes, such as 47,XXY (Klinefelter Syndrome). In this case report, we describe, as far as we know, the first diagnosis of a rare case of male 48, XXYY, which can be detected by QF PCR.

Methods. A 42 year old man suffering from azoospermia was referred to the Cytogenetic and Molecular Biology Unit of Andros Day Surgery for cytogenetic analysis of a peripheral blood sample. Karyotype showed 48,XXYY. Afterwards, we carried out QF PCR on the same sample to check if it was able to detect this aneuploidy. QF-PCR was performed by amplification of specific STR markers and capillary electrophoresis. Regarding X chromosome, five STR markers were amplified (DXS6803, DXS6809, HPRT, AMXY and X22); for Y chromosome, two STR markers were amplified (AMXY and X22). Polymorphic AMXY gene (amelogenin) belonging to X chromosome (AMXY-X) is different to polymorphic AMXY gene belonging to Y (AMXY-Y): electrophoretogram of QF PCR products shows two different peaks, related to 104 bp (AMXY-X) and 109 bp (AMXY-Y).

Results. QF-PCR showed two peaks with ratio 1:1 for AMXY-X and AMXY-Y that are found in a normal male, but we also found two peaks with ratio 1:1 for DXS6803 and DXS6809 markers as in a normal female. Amplification of HPRT and X22 was not informative. Only the presence of two X chromosomes and two Y chromosomes could be related to our findings.

Conclusions. In our patient, cytogenetic analysis highlighted a 48,XXYY karyotype; QF PCR confirmed the diagnosis. Our results show that more complex sex chromosomal aneuploidies can also be detected by QF PCR. In conclusion, QF PCR is a rapid and reliable method for pre- and post-natal diagnosis of common as well as uncommon aneuploidies involving 13, 18, 21, X and Y chromosomes.

Reference. Cirigliano V. et al. Mol Hum Repr 2004;10:839-46

037

PHENOTYPIC COMPARISON BETWEEN MYOFILAMENT POSITIVE AND MYOFILAMENT NEGATIVE HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY AMONG ITALIANS

F. Girolami¹, I. Olivotto¹, I. Passerini¹, A. Mariottini¹, F. Cecchi², F. Torricelli¹

¹SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Fiernze

²Dip. di Cardiologia, AOU Careggi, Firenze

Background. Mutations in sarcomere myofilament protein genes represent the most prevalent cause of hypertrophic cardiomyopathy (HCM). A collective clinical characterization of myofilament positive as opposed to negative HCM has never been attempted.

Methods. A cohort of 203 unrelated HCM patients (age 50±18 years, 36% female) was followed for 4.0÷1.7 years following genetic screening for myosin binding protein C (MYBPC3), beta-myosin heavy chain (MYH7), regulatory and essential light chains (MYL2 and MYL3), troponin-T (TNNT2), troponin-I (TNNI3), alpha-tropomyosin (TPM1), and alpha-actin (ACTC), by DHPLC and automatic sequencing.

Results. Sixty-nine mutations were identified in 126 myofilament positive HCM patients (62%). Compared to myofilament negative (n=77), positive patients were younger at diagnosis (41 vs. 46 years; p=0.06), and more often had family history of HCM (36% vs. 17%, p<0.01) or sudden death (18% vs. 8%, p<0.01). Patients with myofilament-HCM showed greater life-time probability of developing systolic dysfunction (LVEF<50%) and restrictive LV filling (transmitral E/A >1.5 and deceleration time <140 ms), irrespective of the myofilament involved. Prospectively, myofilament positive status was associated with a 4.27 independent relative risk of cardiovascular death, non-fatal stroke or progression to NYHA class III/IV (95% confidence interval 1.46-12.48, p=0.0079). This endpoint occurred at a wide age range in myofilament positive patients (14-86 years), but only ≥65 years in myofilament negative.

Conclusions. HCM due to myofilament protein gene mutations was associated with greater prevalence of LV dysfunction and substantially worse prognosis compared to myofilament negative disease, irrespective of the myofilament involved. These findings for the first time demonstrate a potential clinical and prognostic role of routine genetic screening in HCM patients.

Reference. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK et al. A report of the American College of cardiology foundation task force on clinical expert consensus documents and the European society of cardiology committee for practice guidelines. *European Heart Journal* 2003; 1-27.

038

HOMOCYSTEINE IN HUMAN COLON CARCINOMA CELLS

M. C. Gueli¹, C. Corrado², R. Alessandro²

¹Dip. Scienze Biochimiche, Università di Palermo, Italia

²Dip. Biopatologia e Metodologie Biomediche, Università di Palermo, Italia

Introduction. Homocysteine (Hcy) is a sulfur-containing amino acid biosynthesized from methionine which takes a key place between the folate cycle and the activated methyl cycle. Malignant diseases are frequently associated with elevated circulating tHcy but the general impression that elevated tHcy is detectable in cancer subjects derives from the fact that many cancer patients take anti-folate drugs. As hypothesized increased serum tHcy in cancer patients before the beginning of any treatment may reflect the total burden of malignant cells.

Objective. To find out whether the tumor cell lines release Hcy into the cell medium during their growth. We used T84 human colon carcinoma cell line to compared free Hcy levels between intracellular and exported medium.

Methods. The Ubbink method with several modifications was used for the HPLC analysis of Hcy levels. Chromatographic analysis was performed with a Waters HPLC system with fluorescence detector. T84 cells were grown in appropriate medium containing all the essential nutrients for 7 days. Aliquotes of the culture medium were taken at various time intervals and assayed for Hcy levels. After 7 days of incubations, T84 cells were washed three times with cold PBS buffer, scraped in NaCl 0.9% and centrifuged. The pellet cells were then resuspended in lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl) and sonicated. Afterwards the supernatants were used for the separation of the SBDF-derivatized thiols.

Results. As expected, we found that T84 tumor cells released high Hcy levels into the exported cell medium after growing for 7 days, compared to Hcy level of intracellular T84 one. In our system, the increase in medium Hcy levels over time in T84 cell line suggests that it might be a combination of a depletion of folate and an increase in cell number due to the rapid proliferation of tumor cells. The amount of Hcy per 1x 10⁶ cells was 478±10 pmol. The medium contained 5.46±0.15 μM Hcy after 7 days of growth. In other words, with a better understanding of the effects of various drugs on tumor cell cultures, the rise and fall of circulating tHcy could be used as a new tumor marker to monitor cancer plasma patients during therapy, together with commonly used tumor markers. Ubbink JB 1991 *JChromatogr* 565, 441.

039

APOLIPOPROTEIN E GENE POLYMORPHISM IN SUBJECTS AFFECTED BY CARDIOVASCULAR DISEASES IN SICILIAN POPULATIONS

E. Lio¹, C. Scazzone¹, S. Cammarieri¹, V. Cucchiara¹, A. Caruso¹, G. Mingoia¹, M. Ciaccio¹

¹Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction. Apo E plays a role in the regulation of lipid metabolism by mediating cellular uptake of lipoprotein particles via Apo E and Apo B/E specific receptors in liver and other tissues. It is classified into 3 major isoforms in human E2, E3 (associated with normal lipidic metabolism) and E4 according to the differences of aminoacids in position 112 and 158. Abnormalities in Apo E are associated with an increased risk of atherosclerosis and ischemic heart disease (IHD) (1). Therefore Apo E genotyping is of increasing importance in clinical practice to identify individuals at risk for these pathologies.

Materials and Methods. In this study we have examined 17 controls subjects (age: 25-65; ♀=10, ♂=7) and 38 patients (age: 24-76; ♀=18, ♂=20) affecting by cardiovascular diseases and without any other risk factors for atherosclerosis. Total genomic DNA was extracted from whole human blood by salting-out procedure. DNA sample were amplified by a polymerase chain reaction and the detection of the polymorphism APO E was investigated by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the enzyme HhaI. The restriction fragments were separated by electrophoresis on 8% polyacrilamide gel.

Results and Discussion. Among the patients, 25 (65.8%) subjects were E3/E3, 6 (15.8%) E2/E3, 1(2.6%) E2/E4 and 6 (15.8%) E4/E4. The control subjects were 14 (82.3%) E3/E3, 1 (5.9%) E2/E3 and 2 (11.8%) E3/E4.

These results suggest that Apo E gene polymorphism is not closely associated with the development of cardiovascular diseases. Thus, the only detection of Apo E genotypes cannot diagnose persons at high risk for developing atherosclerosis. In fact our finding suggest that, the potentially favourable and unfavourable pattern of Apo E allele distribution is modulated by dietary or other life style related factors.

Reference. R. Frikke-Schmidt et al., (2000) J. Am. Coll. Cardiol. 35:1192-1199.

040

NUOVE MUTAZIONI DELLA GLUCOSIO-6-FOSFATO DEIDROGENASI NELLA POPOLAZIONE DEL LAZIO

D. Maffi¹, M. T. Pasquino¹, M. R. D'Apice², P. Caprari¹, M. P. Caforio¹, P. Cianciulli³, F. Sorrentino³, G. Novelli², A. M. Salvati¹

¹Dip. Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

²Dip. Biopatologia e Diagnostica per Immagini, Università di Tor Vergata, Roma

³Day Hospital Talassemici, Osp. S. Eugenio, Roma

Uno studio per la definizione delle basi molecolari del deficit di G6PD nel Lazio, ha confermato la presenza di alcune mutazioni comuni nella popolazione italiana e sono state individuate tre nuove mutazioni. Sono stati esaminati, applicando un protocollo di analisi molecolare descritto precedentemente (1), 453 soggetti residenti nel Lazio, di cui 205 M e 236 F con attività enzimatica ridotta e 52 F con attività normale ed anamnesi personale o familiare positiva.

Le varianti già descritte in Italia presentavano le seguenti frequenze: G6PD Mediterranea 63%; G6PD Seattle 15%; G6PD A- 5%; G6PD Chatam 3%; G6PD Union, Cassano, Sibari, Abruzzo 1%. In 2 pazienti di origine italiana sono state individuate le varianti Ube e Radlowo, precedentemente descritte rispettivamente in Giappone ed in Polonia. Inoltre sono state caratterizzate tre nuove mutazioni: i) G6PD Lazio (E 3, nt 130 GCC→ACC; aa 43 Ala→Tyr) in un paziente di 16 anni, affetto da favismo, e nella madre, ambedue nati a Roma. L'attività enzimatica residua era 1,36 U/gHb (20% dell'attività normale) nel proposito e 4,07 U/gHb nella madre. Secondo la classificazione dell'OMS questa variante può essere attribuita alla III classe.ii) G6PD Veneto, (E 9 nt 1021 GTC→TTC; aa 340 Val→Phe) in un bambino di 15 mesi con ambedue i genitori di origine veneta. L'attività enzimatica era di 0,9 U/gHb (10% dell'attività normale) e la variante può essere attribuita alla II classe. iii) G6PD Calabria (E 7, nt 751 GAT→AAT; aa 250 Asp→Asn) in una donna eterozigote con attività enzimatica normale (5,81 U/gHb). La paziente presentava contemporaneamente omozigosi per il polimorfismo in E 11, nt 1311. Non è possibile attribuire la classificazione dell' OMS a questa variante poiché non sono stati esaminati familiari emizigoti con la stessa mutazione. Il 10% dei casi è ancora oggetto di studio.

Bigliografia. Pasquino MT, Maffi D, D'Apice MR, Caprari P, Caforio MP, Cianciulli P, Sorrentino F, Novelli G, Salvati AM. Protocollo avanzato per la diagnosi molecolare del deficit di Glucosio-6-fosfato deidrogenasi. *Biochimica Clinica* 2003, 27 suppl. 3, pg 67.

041

METODI DI ESTRAZIONE DEL DNA VIRALE: CONFRONTO TRA METODICHE

M. Bergallo¹, C. Costa¹, F. Sidoti¹, S. Margio¹, A. Negro Ponzì¹, R. Cavallo¹

¹Dip. di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U Virologia, Università di Torino

Introduzione. L'utilizzo di un efficiente metodo di estrazione e purificazione del DNA è fondamentale per ottenere risultati affidabili mediante PCR sia nell'ambito della diagnostica che della ricerca. Infatti, uno dei principali limiti della PCR è l'inibizione dell'amplificazione da parte di sostanze eventualmente presenti.

Scopo. Confrontare sei diversi metodi di estrazione del DNA in termini di percentuale di recupero e purezza del DNA e capacità di prevenire l'inibizione dell'amplificazione.

Materiali e Metodi. A 10 campioni di urine e siero – precedentemente risultati negativi per BKV-DNA ad una nested-PCR specifica per l'amplificazione del Large T antigen- è stata aggiunta una quantità nota di pBKV (400 ng). Ogni campione è stato sottoposto ad estrazione in quintuplicato per un totale di 50 procedure di estrazione da urine e 50 da siero. Sono stati posti a confronto i seguenti protocolli di estrazione: A, kit di estrazione Extragen (Amplimedical); B, estrazione con tampone di lisi associato a coagulazione delle proteine mediante bollitura; C, estrazione con il solo tampone di lisi; D, estrazione con fenolo/cloroformio seguita da precipitazione con etanolo; E, metodo di Boom (silica gel); F, estrazione con lisi mediante digestione enzimatica con proteinasi K. I sei protocolli di estrazione sono stati confrontati in base a: 1) efficienza di recupero (percentuale di recupero di pBKV rispetto ai 400 ng iniziali, determinata mediante spettrofotometro); 2) purezza del DNA estratto (mediante lettura spettrofotometrica del rapporto di assorbanza 260/280 nm); 3) presenza di inibitori (in base alla negatività della nested PCR).

Conclusioni. I metodi di estrazione del DNA valutati hanno evidenziato diverse performance in termini di percentuale di recupero e purezza del DNA e capacità di prevenire l'inibizione dell'amplificazione. La scelta del metodo di estrazione sembra quindi legata ai requisiti del DNA per l'utilizzo successivo.

042

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI GENI LITICI E DI LATENZA DI EBV: SVILUPPO DI UNA MULTIPLEX-NESTED RT-PCR

M. Bergallo¹, C. Costa¹, S. Margio¹, F. Sidoti¹, C. Merlino¹, R. Cavallo¹

¹Dip. di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U Virologia, Università di Torino

Introduzione. Il virus di Epstein-Barr (EBV) appartiene alla famiglia delle herpesviridae, è in grado di determinare infezioni litiche in cellule epiteliali ed infezioni latenti e trasformanti in linee cellulari linfoidi. La disponibilità di strumenti in grado di discriminare tra infezione latente e riattivata è utile nella valutazione dei pazienti trapiantati.

Razionale. Lo scopo di questo lavoro è la messa a punto di due multiplex-nested RT-PCR per valutare la presenza dei trascritti dei geni latenti (BKRF1, BYRF1, BNLF1 e LMP2) e litici (BZLF1, BALF2 e BcLF1) di EBV nei PBMC. **Materiali e Metodi.** La metodica è stata messa a punto su cellule Raji (ATCC CCL-86) indotte con TGF- β (Transforming Growth Factor beta 1) e PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) per attivare il ciclo litico e su 3 gruppi di controllo: (I) soggetti pediatrici immunocompetenti con infezione primaria, (II) pregressa, (III) sieronegativi; e applicata ad un gruppo di adulti trapiantati renali asintomatici.

Risultati. I risultati confermano che, in corso di infezione primaria, nei PBMC sono rilevabili i trascritti litici di EBV: BALF2 (77,8%), BcLF1 (70,4%) e BZLF1 (33,3%). L'11,1% dei pazienti presenta LMP2, il 18,5% LMP1, EBNA1 e EBNA2 sono assenti. Nel gruppo III non sono riscontrabili trascritti litici e latenti, mentre nel gruppo II sono identificabili: LMP2 (60%), EBNA1 (53,5%), LMP1 e EBNA2 sono assenti. Nei soggetti trapiantati, 7 pazienti hanno una carica di EBV-DNA di 1000 copie/105 PBMC e 1/7 di 5000 copie /105 PBMC. Il 66,6% è positivo per LMP2 e il 20% per LMP1, tutti sono negativi per EBNA1 e EBNA2. Il 96,7% è negativo per i trascritti litici, mentre il 33,3% è positivo per BcLF1. Non si riscontra una significativa correlazione tra l'espressione di geni latenti e litici e la carica di EBV-DNA.

Conclusioni. In conclusione, le due multiplex-nested RT-PCR consentono di valutare l'attività trascrizionale di EBV e possono essere affiancate al monitoraggio della carica virale nei PBMC nei trapiantati renali per definire i fattori predittivi positivi per lo sviluppo di PTLD EBV-correlati.

043

ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA NEL CARCINOMA GASTRICO MEDIANTE MICROARRAY E VALIDAZIONE IN REAL-TIME PCR

G. Marseglia¹, G. Nannetti¹, A. Magi¹, C. Giuliani¹, A. Rinnovati², F. Torricelli¹

¹SOD Diagnostica Genetica, Azienda Ospedaliera-Universitaria Careggi, Firenze

²U. O. Chirurgia Generale ASL8, Zona Casentino, Arezzo

Lo sviluppo delle conoscenze e delle tecniche di miniaturizzazione degli strumenti e di micromanipolazione dei campioni biologici (tecnologie array) permette oggi di studiare migliaia di geni contemporaneamente. La tecnologia dei DNA-Microarray fornisce infatti in un singolo esperimento informazioni sull'espressione di singoli geni e sulle interazioni globali gene-gene. Lo scopo del nostro lavoro è quello di valutare, mediante tecnologia microarray e secondo i protocolli sviluppati alla Università di Stanford, l'espressione genica nella patologia del cancro gastrico. La tecnologia Stanford prevede la coibridazione sullo stesso array dell'RNA estratto da tessuto sano, e dell'RNA estratto da tessuto tumorale. Sono stati effettuati 10 esperimenti microarray su soggetti affetti da cancro gastrico seguiti presso la U.O. Chirurgia Generale ASL8 zona Casentino. In particolare, per ogni paziente, l'RNA è stato estratto da una biopsia di mucosa gastrica tumorale e da un frammento di mucosa sana adiacente all'area tumorale. Alla scansione del vetrino su ciascuno spot saranno presenti due segnali di fluorescenza dovuti alla coibridazione del cDNA test e del cDNA controllo. La quantificazione dei livelli di espressione si basa sulla valutazione dei rapporti delle fluorescenze (Cy3/Cy5 o Cy5/Cy3) riscontrati in ogni spot.

L'analisi dei dati ottenuti ed il confronto con quelli presenti in letteratura, ha fornito numerose informazioni in merito all'espressione differenziale, tra test e controllo, di geni implicati in diversi meccanismi cellulari (geni ad azione antiapoptotica, geni coinvolti nello sviluppo, crescita, motilità cellulare e metastasi). Dai dati ottenuti 237 geni risultano differenzialmente espressi di cui 33 geni il medesimo pattern di espressione in tutti i casi esaminati: 9 geni sono up regolati e 24 geni sono down regolati.

Nella fase finale dello studio abbiamo validato i dati di espressione utilizzando tecniche Gold Standard come la real time PCR (7900HT Fast Real-Time PCR System).

Bibliografia. Werner M et al. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *Cancer Res Clin Oncol.* 2001 Apr

044

DETECTION OF MUTATED K-RAS SEQUENCES AS MARKERS IN THE STOOL AND BLOOD OF PATIENTS WITH PANCREATIC MASS

R. Pezzilli¹, A. Barassi², F. Pallotti³, G. De Luca³, L. Fantini¹, R. Corinaldesi¹, G. V. Melzi d'Eril²

¹Dip. di Medicina Interna, Osp. Sant'Orsola-Malpighi, Bologna

²Dip. di Medicina, Chirurgia, Odontoiatria, Università di Milano, Milano

³Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università dell'Insubria

Introduction. Previous studies have demonstrated the possibility of detecting K-ras mutations in the plasma of patients with malignant pancreatic mass. However, the data available are scarce and the papers published have not considered the entire spectrum of pancreatic diseases forming mass. We planned this prospective study to evaluate the presence of K-ras mutations in blood and faeces in order to differentiate malignant from benign pancreatic masses.

Patients. Fifty consecutive patients (30 males, 20 females, mean age 67 years, range 34-91), with abdominal mass of possible pancreatic origin were enrolled in the present study. The final diagnoses were as follows: pancreatic adenocarcinoma in 19 patients, malignant cystic tumor of the pancreas in 3, pancreatic endocrine tumors in 3, chronic pancreatitis in 13, complicated acute pancreatitis in 6, benign congenital pancreatic mass in 2 and non pancreatic masses in the remaining 4.

Methods and Results. A blood and stool specimen were obtained on the same day from all patients enrolled, after they had given their informed consent. After DNA isolation, PCR amplification was performed following the method by Nishikawa et al (*Clin Chim Acta* 118, 107-112, 2002). Briefly, the region encompassing codon 12 of K-ras was amplified using a mismatch primer creating a BstNI site for wildtype molecules. An aliquot of PCR product was digested with BstNI and analyzed by polyacrilamide gel electrophoresis followed by silver staining. If there was no mutation of K-ras codon 12, the full 107-bp PCR product was cleaved into 77 and 30-bp fragments. K-ras mutations were detected in none of the blood and stool specimens of the patients studied.

Conclusion. Our data clearly show that, at least under our experimental conditions, the search for K-ras mutations in blood and in stools is not useful for differentiating benign and malignant pancreatic masses. Further studies on different biological substances should be evaluated in order to find a simple, useful genetic marker of pancreatic malignancy.

References. Marchesi et al. Low Correspondence Between K-ras Mutations in Pancreatic Cancer Tissue and Detection of K-ras Mutations in Circulating DNA. *Pancreas* 2006;32:171-177.

045

APPROCCIO MULTILIVELLO ALLA DIAGNOSI MOLECOLARE DI FIBROSI CISTICA

B. Minuti¹, E. Pelo¹, C. Centrone¹, C. Romolini¹, I. Giotti¹, T. Repetto², F. Torricelli¹

¹SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze

²Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica, AOU A. Meyer, Firenze

Nel gene CFTR sono descritte oltre 1000 mutazioni, molte hanno una frequenza inferiore all'1% e alcune sono definite "private", questa grande variabilità rende difficile la caratterizzazione genetica dei pazienti con Fibrosi Cistica. Questo influisce sulla consulenza genetica ai pazienti e ai loro familiari e, in prospettiva, anche alla terapia genica. Lo studio del gene può essere attualmente articolato in 3 livelli diagnostici che si distinguono per tecnologia, tempi e costi.

Sono stati studiati 245 pazienti afferenti al Centro Regionale Toscano FC. Analisi di I livello eseguita con PCR OLA (Abbott-Celera Diagnostics). Analisi II livello studio dell'intero gene mediante DHPLC (Transgenomic) e sequenziamento. Analisi III livello: analisi con tecnica MLPA per evidenziare delezioni a carico del gene.

Con il test diagnostico di I livello, sono stati caratterizzati 373/490 cromosomi, identificando il 76.1% delle mutazioni responsabili di Fibrosi Cistica nei pazienti toscani.

Lo scanning del gene CFTR in 97 dei 118 cromosomi non identificati ha permesso la caratterizzazione di altri 57 cromosomi portando la percentuale di identificazione all'88.2%. Lo studio con questa tecnica ha rilevato 3 mutazioni non precedentemente descritte e riferite quindi al consorzio, oltre alla microdelezione 4169delCTAAGCC. Fra i 40 alleli non identificati con gli esami di I e II livello, 29 sono stati studiati con tecnica MLPA e in 18 di questi (62%) sono state trovate delezioni riguardanti uno o più esoni, costituendo il 3,9% di tutte le mutazioni.

La caratterizzazione delle mutazioni CFTR rimane difficile, nonostante l'applicazione di tecniche di sequenziamento dell'intero gene. Nella nostra casistica, dopo tale test, restano ancora non identificate il 7.9% delle mutazioni. L'applicazione di una nuova tecnica di ricerca delle grandi delezioni ha permesso un'ulteriore passo avanti: più della metà degli alleli negativi ai test di I e II livello è risultato portatore di grandi delezioni che costituiscono, nella nostra casistica il 3,9% di tutte le mutazioni identificate.

Bibliografia. Ferec C et al. "Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanism" *Hum Mutat* 2004;23:343-357

046

APPLICAZIONE DIAGNOSTICA DELLA METODICA CGH-ARRAY PER LA COSTRUZIONE DI ARRAY LOCUS-SPECIFICI

G. Nannetti¹, G. Marseglia¹, A. Magi¹, V. Pecile², E. Lenzi³, C. Bortolozzo⁴, S. Mason¹, F. Torricelli¹

¹SOD Diagnostica Genetica Azienda Ospedaliera-Universitaria Careggi, Firenze

²U.O.C. di Genetica IRCCS Burlo, Trieste

³Lab.C.C.e FISH Centro Malattie Rare Dipartimento di Pediatria Az. Ospedale-Università, Padova

⁴AB Analitica Padova

La CGH-Array è una nuova tecnologia in grado di rilevare anomalie cromosomiche strutturali con una più alta e più ampia risoluzione rispetto alle metodiche convenzionali utilizzate nella diagnostica clinica corrente. La CGH-Array è basata sugli stessi principi della CGH classica ma a differenza di quest'ultima, la CGH-Array utilizza i vetrini come supporto utile per la stampa di sequenze di DNA complementari a loci specifici di cromosomi umani. Lo scopo del lavoro è stato quello di sviluppare tale metodica, dalla stampa dei vetrini al protocollo di ibridazione, per la costruzione personalizzata di array locus-specifici che permettano di analizzare contemporaneamente più regioni cromosomiche. In particolare, la validazione della fase di stampa dei vetrini permetterà di creare una personalizzazione dell'array così da studiare regioni cromosomiche di interesse a seconda del caso clinico in esame.

Come modello iniziale la CGH-Array è stata applicata ad una casistica di soggetti affetti da ritardo mentale idiopatico precedentemente caratterizzati nel nostro laboratorio mediante Hr-CGH e metodica FISH.

Abbiamo pertanto stampato vetrini utilizzando più sonde per ciascuna regione subtelomeric e abbiamo messo a punto il protocollo di ibridazione che prevede la competizione tra due campioni di DNA genomico (test e controllo) marcati con fluorocromi diversi e coibridati in quantità equimolari sull'array. La rilevazione dei segnali di fluorescenza di ogni singolo spot è resa possibile mediante l'utilizzo di uno scanner e la presenza di riarrangiamenti cromosomici nel DNA test viene valutata mediante la quantificazione delle differenze esistenti nell'emissione di fluorescenza tra il campione da analizzare e quello di riferimento. L'analisi statistica, condotta utilizzando software dedicati, ha confermato i risultati ottenuti precedentemente con le due metodiche di citogenetica molecolare.

L'automazione di questa metodica e le sue potenzialità, date dalla possibilità di ampliare le regioni in studio eseguendo un unico esperimento di ibridazione, permetteranno alla CGH-Array di divenire una delle metodologie dominanti nella diagnosi degli squilibri cromosomici.

Bibliografia. Veltman JA et al. *Hum Genet* 2002 May

047

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

I. Passerini¹, A. Sodi², F. Girolami¹, A. Mariottini¹, U. Menchini², F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze*

²*Clinica Oculistica, AOU Careggi, Firenze*

Best's disease is an autosomal dominant early-onset form of macular degeneration in which the primary defect is thought to occur at the level of the retinal pigment epithelium. VMD2 gene, considered responsible for the disease, mapped to the long arm of chromosome 11, and it codifies a protein, Bestrophin, with a possible pathogenetic involvement in causing Best disease. In this study we screened for mutations the VMD2 gene in Italian patients with Best maculopathy.

Seven families were recruited from central and southern Italy, and family members were evaluated by standard ophthalmologic examination. All affected patients and some of the unaffected family members had a blood sample drawn, and the DNA was analyzed for mutations in all 11 exons of the VMD2 gene by DHPLC approach and direct sequencing techniques. Some mutations of the VMD2 gene have been detected in all the affected patients and in some unaffected relatives. Most of the mutations have already been described in the literature; a novel mutation (R218G) was detected; it is a missense mutation and it involves an aminoacid which has been reported to be highly conserved across different species: this particular aminoacid may represent a mutation hotspot with particular functional relevance; it is probably located in a protein region serving as a site of attachment or an active site for an enzyme. It is interesting to remark that in this series the same mutation was associated with some differences in clinical phenotypes; in fact in one family the R218C mutation was associated with the onset of choroidal neovascularization in the affected mother and her son, while no CNV was reported in another family sharing the same mutation. Another family with the R25W mutation showed a multifocal location of the vitelliform deposits, while another family with the same mutation showed a typical isolated vitelliform disc in the macular area. In spite of the small number of studied families it was possible to remark a certain phenotype heterogeneity.

Reference. Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). Marquardt A. et al. *Human Molecular Genetics* (1998), Vol.7, N.9, 1517-1525.

048

RELAZIONE TRA I VALORI DEL 17OHP E LA DIAGNOSI MOLECOLARE DEL DEFICIT DELLA 21-IDROSSILASI IN UNA POPOLAZIONE AFFETTA DA PUBARCA PREMATURO

O. Porzio¹, R. Iori¹, M. Malaponti¹, G. Scirè³, B. Boscherini³, M. Cappa², R. Ruggia¹, G. Federici¹

¹*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario di "Tor Vergata", Roma, Italia*

²*Dipartimento di Pediatria, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia*

³*Dipartimento di Pediatria, Università di Roma "Tor Vergata", Roma, Italia*

Si definisce pubarca precoce (PP) la comparsa di peluria pubica prima degli 8 anni nelle bambine e dei 9 anni nei maschi. È stato descritto che alcuni casi di PP sono associati a sindrome adrenogenitale (SAG), determinata nel 90-95% dei casi da deficit della 21-idrossilasi surrenalica (21OHD), che converte il 17OH-progesterone (17OHP) in 11-desossicortisolo. La diagnosi biochimica di SAG viene eseguita principalmente mediante dosaggio del 17OHP basale e dopo stimolazione con ACTH, ma tuttora non esiste una sicura definizione del valore patologico. Negli ultimi anni la diagnosi molecolare del 21OHD ha permesso di distinguere le diverse forme cliniche della SAG, i soggetti eterozigoti o i pubarchi precoci idiopatici. Allo scopo di stabilire una relazione tra i valori biochimici e la diagnosi molecolare del 21OHD, in una popolazione pediatrica affetta da PP sottoposta al dosaggio del 17OHP prima e dopo ACTH, sono stati selezionati i pazienti che presentavano valori del 17OHP dopo stimolo superiori a 500 ng/dl. In questi è stata eseguita la ricerca nel gene CYP21 delle 8 mutazioni puntiformi comuni mediante sequenziamento automatico e dei grossi riarrangiamenti mediante Southern Blot.

In base al genotipo riscontrato, la popolazione è stata suddivisa in 3 gruppi: A) assenza di mutazioni (n.35) B) 1 mutazione o riarrangiamento (n.31) C) 2 mutazioni o riarrangiamento omozigote (n.31). Il valore medio del 17OHP basale e dopo ACTH è risultato di 177.5±93.1 e 679.2±142 ng/dl, 259.7±203.2 e 1061.3±392.3 ng/dl, rispettivamente nei gruppi A e B, con ampia sovrapposizione dei valori. Nel gruppo C il 17OHP basale e dopo ACTH è risultato di 1494±1177 e 3738±1990 ng/dl.

Dall'esame dei risultati ottenuti è possibile concludere che il dosaggio del 17OHP basale o dopo stimolo con l'ACTH non è in grado di discriminare tra pazienti normali o portatori di una mutazione/riarrangiamento del CYP21, per i quali la diagnosi genetica rappresenta l'esame fondamentale per l'inquadramento clinico. I pazienti affetti da 21OHD sono invece distinguibili mediante i valori biochimici e la determinazione del genotipo permette una conferma diagnostica ed un corretto screening familiare.

Bibliografia. White PC, Speiser PW 2000. *Endocr Rev* 21:245-291

049

POLIMORFISMI HLA NELLA MALATTIA CELIACA E ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI

A. Russo¹, C. Bonaguri¹, L. Battistelli¹, R. Aloe¹, G. L. De'Angelis², F. Fornaroli², R. Perini¹, M. Ferrari¹, C. Monica¹

¹U.O. Lab. Analisi Emato-Chimiche, Az. Osp. Univ. Parma, Parma

²U.O.S. Gastroenterologia Endoscopia Digestiva Ped., Az. Osp. Univ. Parma, Parma

Introduzione. Nella eziopatogenesi della Malattia celiaca (MC) la predisposizione genetica riveste un importante ruolo: infatti, la MC sembra ristretta a soggetti che esprimono particolari molecole del complesso maggiore di istocompatibilità, in particolare l'antigene DQ2 (HLA-DQA1*05/DQB1*02), in casi più rari le molecole DQ8 (HLA-DQA1*03/DQB1*0302) o DR4 (HLA-DRB1*04).

La stretta associazione alplotipica permette di utilizzare l'identificazione di questi polimorfismi per scopi diagnostici affiancandola ai test sierologici autoanticorpali attualmente in uso. Obiettivo dello studio è stato valutare la correlazione fra espressione dei differenti polimorfismi HLA associati alla MC e risultati al test anti-tTG.

Materiali e metodi. Il nostro studio ha valutato i pazienti per i quali, dal Gennaio 2005 al Marzo 2006, è stata richiesta alla Sezione di Autoimmunologia della U.O. Lab. Analisi la caratterizzazione HLA DQ2 e DR4 e il test anti-tTG per finalità diagnostiche o per l'identificazione di individui a rischio nei familiari di primo grado di pazienti celiaci.

L'eterodimero HLA DQ2 e l'allele DR4 sono stati caratterizzati con la metodica PCR utilizzando un sistema di rivelazione in ibridizzazione inversa su strip (Amplimedical Bioline) (1).

Per il test anti-tTG è stata utilizzata una metodica ELISA (Generic Assay/Alifax).

Risultati. Sono stati reclutati nello studio 231 pazienti.

I soggetti che esprimevano il DQ2 sono risultati 121 con una percentuale di positività per Ab anti-tTG del 24.8% (30/121).

I soggetti che mostravano polimorfismi per un solo allele (DQA1, DQB1) o per il DR4 sono risultati 110 con una percentuale di positività anti-tTG del 3.6% (4/110).

Le differenze osservate fra i 2 gruppi sono risultate statisticamente significative ($p < 0.01$).

Conclusioni. Il valore predittivo positivo dei polimorfismi HLA nella MC è molto basso, manifestandosi la malattia in un numero ristretto di soggetti che presentano tali polimorfismi.

Risulta interessante rilevare come nel gruppo di soggetti valutati la positività al test anti-tTG risulti significativamente differente nei vari alplotipi.

Bibliografia. Sacchetti L et al. Rapid Identification of HLA DQA1*0501, DQB1*0201, and DRB1*04 Alleles in Celiac Disease by a PCR-Based Methodology; Clin Chem 43:2204-2206;1997.

050

ANALISI MOLECOLARE DEL GENE F8C IN PAZIENTI CON EMOFILIA A DEL SUD-ITALIA

V. Sanna¹, P. Nardiello¹, V. D'Argenio¹, G. Castaldo², A. Rocino³, A. Coppola⁴, G. Di Minno⁴, F. Salvatore¹

¹Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II" e CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli

²Facoltà di Scienze, Università del Molise, Isernia

³Centro Emofilia e Trombosi, Osp. S. G. Bosco, Napoli

⁴Centro di Coordinamento Regionale Emocoagulopatie, Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Napoli "Federico II", Napoli

L'Emofilia A è il più comune disordine ereditario della coagulazione ed è dovuto all'alterata sintesi del Fattore VIII (FVIII). Si trasmette con modalità recessiva legata al sesso ed ha un'incidenza di 1/5000 nati maschi. In base all'attività del FVIII circolante, si distinguono tre forme: lieve, moderata e severa.

Il gene che codifica per il FVIII (F8C) è composto da 26 esoni e fino ad oggi sono state identificate oltre mille mutazioni causative, distribuite lungo tutto il gene; ad eccezione delle inversioni degli introni 22 e 1, che sono le mutazioni più frequenti responsabili della forma severa, le altre mutazioni sono per la maggior parte puntiformi ed in circa il 30% dei casi sono de novo. E' quindi utile disporre di un database di mutazioni di tutti i pazienti noti per determinare l'eventuale stato di portatrice nelle consanguinee ed eseguire le diagnosi prenatali ove richiesto.

Nel nostro studio sono stati inclusi 114 pazienti emofilici non correlati (88 gravi, 26 moderati e lievi). Negli 88 gravi abbiamo eseguito la ricerca dell'inversione dell'introne 22 mediante Long distance PCR o Southern blot e/o la ricerca dell'inversione dell'introne 1 mediante PCR, identificando 59 pazienti positivi all'inversione dell'introne 22 e 2 positivi all'inversione dell'introne 1. Per i 27 casi gravi negativi alle due inversioni e per i casi moderati e lievi abbiamo eseguito lo screening dell'intero gene F8C mediante sequenziamento.

Sono state identificate 47 mutazioni causative, di cui 21 nuove; in 6 pazienti non è stata riscontrata alcuna mutazione.

L'analisi molecolare è in grado di identificare la mutazione causativa in circa il 95% dei casi. E' importante sottolineare che nel caso in cui venga riscontrata un'alterazione nuova di tipo missense è necessario escludere la possibilità che si tratti di una variante polimorfica, confermandone la presenza nei soggetti affetti della famiglia, valutando il grado di conservazione dell'aminoacido sostituito ed escludendone la presenza in un congruo numero di soggetti sani.

Il lavoro è supportato da contributi della Regione Campania (L. 502/92, annualità 2002) e dell'Università del Molise.

051

VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' TIMICA NEI PAZIENTI ONCOEMATOLOGICI DOPO TRAPIANTO ALLOGENICO NON MIELOABLATIVO

C. Sfiligoi¹, S. Cena¹, L. Cimolin¹, P. Omedè¹, M. Gilestro¹, E. Galletto¹, L. Veneziano¹, M. Giarin¹, M. Boccadoro¹, B. Bruno¹

¹*Divisione Universitaria di Ematologia, Az. Ospedaliera S. Giovanni Battista-Molinette, Torino*

Recentemente si sono sviluppati protocolli clinici che permettono di trapiantare cellule staminali emopoietiche dopo un condizionamento non mieloablativo fino a 65-70 anni. La rieducazione timica dei linfociti T, che origina da precursori del donatore, è caratterizzata dal riarrangiamento genico delle catene variabili del T Cell Receptor (TCR). A ogni riarrangiamento si ha la delezione di frammenti molto stabili di DNA extracromosomiali definiti TCR Excision Circles (TRECs) quantificabili nel sangue periferico (PB) che rispecchiano fedelmente l'attività timica. Il nostro studio monitorizza molecolarmente la ricostituzione immunologica timo dipendente dopo trapianto allogenico non mieloablativo nei pazienti anziani. L'analisi quantitativa dei TRECs viene effettuata con tecniche di real-time PCR, basata sull'impiego della tecnologia TaqMan. Il contenuto di TRECs viene quantificato in cellule mononucleate separate con ficoll da campioni di PB e campioni di linfociti T CD3/CD4+ e CD3/CD8+, purificati con tecniche di cell sorting, prima del trapianto e con analisi seriate post-trapianto a 3,6,12 mesi e quindi a scadenze semestrali. I dati preliminari, espressi in TRECs/100 ng DNA, ottenuti sui primi 33 pazienti (valori mediani: 1.1/μl (range 0-54), 2.3/μl (0-103), 7.8/μl (0-50), 3.0/μl (0-56), 8.3/μl (0-557/μl) a 3, 6, 12, 18, 24 mesi rispettivamente) indicano che, seppur lenta, esiste una graduale rieducazione timica durante i primi due anni post-trapianto, suffragata in parte anche dall'aumento del contenuto di CD3+/CD4+ con profilo naive osservato in citofluorimetria. Inoltre, l'analisi effettuata su pazienti con follow-up superiore ai due anni, anche se, per ora, su un limitato numero di campioni, conferma un ulteriore recupero dei valori dei linfociti T timo-dipendenti. La conferma dell'attività timica nei pazienti anziani è anche suffragata dal mancato riscontro di livelli di TRECs nel sangue periferico di un paziente leucemico precedentemente timectomizzato. I risultati ottenuti dimostrano l'esistenza di un'attività timica anche in pazienti anziani sottoposti a trapianto allogenico. Il monitoraggio molecolare dei TRECs potrà portare ad interventi terapeutici attualmente in fase di studio (IL-7) per facilitare la ricostituzione immunologica.

052

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX NESTED PCR FOR THE DETECTION OF BKV, JCV AND SV40

M. Bergallo¹, C. Costa¹, S. Margio¹, F. Sidoti¹, G. P. Segoloni², A. Negro Ponzi¹, R. Cavallo¹

¹*Dept. of Public Health and Microbiology, Virology Unit, University of Turin*

²*Dept. of Internal Medicine, Renal Transplant Unit, University of Turin*

A multiplex nested PCR (mnPCR) method was developed for detecting and differentiating simultaneously the DNA of polyomaviruses JC, BK and SV40 in a single tube. In the first amplification step the same set of primers were used to amplify a conserved DNA region of the large T antigen gene of JCV, BKV and SV40. The second round was carried out using a set of primers designed to obtain products of different size for each related virus. Subsequently, the sensitivity of the mnPCR was maximized by optimizing parameters such as primers, magnesium and dNTPs concentrations. The sensitivity of the method ranged between one and 10 copies of polyomavirus genome. The mnPCR was then employed for detecting polyomavirus DNA in urine, serum and biopsy specimens from renal transplant recipients. Based on the results obtained, the mnPCR developed in our study represent an useful tool for supporting the diagnosis of polyomavirus infection and could be used for epidemiological purposes and in order to better define the role of polyomaviruses in human disease.

053

QUANTITATIVE-PCR TO MEASURE HUMAN PARVOVIRUS B19-DNA LOAD IN SERUM SAMPLES

C. Costa¹, M. Bergallo¹, F. Sidoti¹, C. Merlino¹, S. Margio¹, R. Cavallo¹

¹Dept. of Public Health and Microbiology, Virology Unit, University of Turin, Turin

B19 virus can persist in immunocompromised patients for several months and sometimes even years due to impaired immune response. Viraemia in persistent and recurrent infection may range from very low to high titres and may be associated with chronic clinical manifestations, such as chronic anaemia.

Several recently developed techniques quantifying B19-DNA have improved laboratory diagnosis of the infection and can help guide the treatment options in persistent infections (i.e. IVIG treatment vs. immunosuppression reduction).

Here we describe the development of a reliable internally-controlled quantitative-competitive (QC)-PCR assay that measures B19-DNA load in serum samples by densitometric analysis of the amplification products for monitoring B19 infection in high-risk patients. A retrospective quantification of B19-DNA in the serum samples from 48 anaemic transplanted patients by the QC-PCR assay we developed in our lab confirmed the presence of B19-DNA in 11 out of 48 samples and showed a viral DNA load between 103 and 108 B19-DNA copies/ml depending on the patients' serostatus [the highest viral load was found in specific IgM positive/IgG negative patients (i.e. in patients with active B19 infection at onset)]; the assay also confirmed B19-DNA negative patients. Our QC-PCR assay may be easily employed in monitoring B19 prototype DNA load to follow persistent infections and to better understand the relation between active B19 infection and occurrence of anaemia and to assess the efficacy of IVIG therapy and/or immunosuppression reduction in clearing the virus in high-risk patients.

054

STUDY OF THE CLUSTER OF INTERLEUKIN 1: THE POLYMORPHISM -511 C/T OF INTERLEUKIN 1 β AND THE VNTR OF INTRON 2 OF INTERLEUKIN 1 RA IN SARDINIAN POPULATION

M. E. Sini¹, G. Baggio², C. Carru¹, P. Maieli¹, L. Musino¹, C. Franceschi³, L. Deiana¹

¹Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università di Sassari

²Azienda Ospedaliera, Università di Padova

³Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Bologna

Introduction. Interleukin 1 is an important proinflammatory cytokine. It increases the expression of a wide variety of the other cytokine genes including Interleukin 6 and interleukin 12. The two IL-1 agonist, IL 1 α and IL 1 β , function through ones of the two members of the IL 1 receptor family: IL 1 receptor I (IL 1 RI). The IL 1 receptor antagonist (IL RA) is a specific, high affinity antagonist that inhibits IL 1 α and IL 1 β , and thus controls the activity exerted by IL 1.

Objective. The aim of this study was to investigate the polymorphism of Interleukin 1 β and the polymorphism vntr of interleukin 1 RA in Sardinian population.

Materials and Methods. DNA sample from 130 centenarians, 80 ninety five years old individuals, 70 ninety years old individuals, 96 eighty years old individuals and 110 sixty years old individuals born and resident in Sardinia. Fragment containing variable numbers of an identical tandem repeat of 86 bp was amplified using a direct PCR. The -511 C/T of interleukin 1 β gene was amplified by PCR. The fragment amplified was treated by enzyme restriction the Eco88I.

Results. For the polymorphism -511 C/T interleukin 1 β : Genotypes frequency: age > 100 : CC 0.4595, CT 0.4144, TT 0.0067; age 95: CC 0.4632, CT 0.4191, TT 0.0367; age 90: CC 0.5614, Ct 0.4093, TT 0.0029; age 80: CC 0.8283, CT 0.3648, TT 0.0098.

The obtained result for interleukin 1 Ra have allowed us to identify 4 alleles that differ for the number of repetitions of the vntr. Besides the 3 alleles described in literature, and normally present in the different populations, we have noticed the presence of a fourth allele.

Discussion and Conclusions. The datum we obtained for the polymorphism - 511 C/T of interleukin 1 β has not shown some significant differences among the various groups for age. The obtained result for interleukin 1 Ra have allowed us to identify 4 alleles that differ for the number of repetitions of the vntr. The data we obtained are preliminary and they bring us prudently to different hypotheses in comparison to the datum obtained in literature.

Reference. Biochimica Clinica, vol. 30 suppl. 1, genn. Febr. 2006, Longevità in Sardinia "The centenarians Island", Orroli 14 maggio 2006

055

THE ROLE OF -308 G/A POLYMORPHISM OF TNF alfa AND -174 G/C POLYMORPHISM OF INTERLEUCHINA 6 IN THE AGEING PROCESSES

M. E. Sini¹, C. Carru¹, M. A. Cuccuru¹, D. Cambedda¹, N. Spanu¹, C. Franceschi², L. Deiana¹

¹*Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica Università di Sassari*

²*Dipartimento di Patologia Sperimentale Università di Bologna*

Introduction. The cytokines regulate intensity and the duration of the immune response, both of cellular and humoral type. Intermediary in the inflammation process by tending to keep it local. Also TNF induces the expression of interleukin 6.

Objective. In this work has been executed a screening of the -308 G/A of TNF α gene in one population sample composed of 130 centenarians subjects and 150 sixty-year old controls, selected in Sardinian population. Materials and Methods. DNA has been extracted according to the phenol- chloroform method. The polymorphism -174 G/C expected the amplification of a fragment from 196 bp and next digestion with the Hsp92II restriction enzyme. The investigation of the polymorphism -308 G/A TNF α has been done by PCR with ARMS technique.

Results. The polymorphism -174 G/C interleukin 6 Genotypes frequency: Centenarians: GG 0.537, GC 0.389, CC 0.074. Controls: GG 0.496, GC 0.44, CC 0.064. $\chi^2 = 5.25$, $P = 0.710$. Alleles frequency: Centenarians allele G 0.731 and allele C 0.716: Controls: allele G 0.269 and allele C 0.284; $\chi^2 = 0.14$, $P = 0.710$.

The polymorphism -308 G/A TNF alfa: Genotypes frequency: Centenarians: GG 0.905 GA 0.095 AA 0.0 Controls: GG 0.816, GA 0.163, AA 0.021. $\chi^2 = 4.13$, $P = 0.042$. Alleles frequency: Centenarians allele G 0.953 and allele A 0.047: Controls: allele G 0.898 and allele A 0.102; $\chi^2 = 0.35$, $P = 0.552$.

Discussion and Conclusion. The observed genotype distribution was that expected in accordance with the Hardy-Weinberg balance and no significant differences in the distributions between centenarians and controls have not been discovered.

In conclusion, it can be said that in this first work phase, in which data are only partial and the two polymorphisms object of our study, represents to current state, the initial approach of a more wide and complete investigation of different cytokines in all the samples of the AKeA Project. Reference. Biochimica Clinica, vol. 30 suppl. 1, genn. Febr. 2006, Longevità in Sardinia "The centenarians Island", Orroli 14 maggio 2006

056

FREQUENZA DELLE MUTAZIONI CFTR IN COPPIE INFERTILI

A. Verri¹, M. Bologna¹, T. Sarno¹, A. Montanelli¹

¹*Lab. Analisi, Istit. Clinico Humanitas, Rozzano, Milano*

La fibrosi cistica è la più diffusa malattia multisistemica, a trasmissione autosomica recessiva, riscontrabile nella popolazione caucasica. Essa si manifesta con una frequenza di 1:2.500, con una percentuale di eterozigoti portatori pari al 4%.

Lo screening di mutazioni del gene CFTR è richiesto ormai da tutti i centri di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) e nel nostro Istituto è stato inserito nel pannello di esami routinari richiesti alle coppie infertili dal Settembre 2001.

Ad oggi sono registrate più di 1400 mutazioni nel CF Mutation Database disponibile in Internet (Cystic Fibrosis Mutation Database, Department of Genetics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>) di cui soltanto alcune hanno una frequenza superiore all'1% mentre nella maggior parte dei casi sono confinate a singole famiglie e definite "private". In Italia la frequenza delle mutazioni CFTR mostra differenze notevoli a livello regionale. Nei nostri pazienti è stata eseguita fino a Maggio 2004 un'analisi genetica molecolare (Reverse Dot-Blot, Innogenetics) in grado di identificare 29 mutazioni oltre alle varianti 5T, 7T, 9T dell'introne 8. A partire da tale data, fino al Luglio 2005 la ricerca è stata estesa a 36 mutazioni mentre, dopo Luglio 2005, il test è stato implementato ulteriormente, prendendo complessivamente in esame 57 mutazioni, con un notevole aumento del "capture rate" che varia dal valore di 74.7% riferito alla regione Lombardia fino ad un massimo di 88.3% ed 88.1% per Basilicata e Sardegna rispettivamente (dati calcolati in base alla frequenza delle mutazioni del gene CFTR in Italia (1)).

Nel poster verranno riportati i risultati dello screening per mutazioni del gene CFTR dalla sua introduzione ad oggi su 2155 pazienti complessivi. La frequenza delle mutazioni rilevate verrà rapportata alle frequenze note.

Riteniamo che lo screening effettuato sulle coppie infertili, possa costituire un valido strumento per ottenere informazioni sulla frequenza dei portatori nella popolazione generale.

Bibliografia. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS, Genova, 19 Giugno 2002

057

VALUTAZIONE DELL'APPROPRIATEZZA DELLE INDAGINI DI BIOLOGIA MOLECOLARE NELLO STUDIO DELLA TROMBOFILIA

M. G. Parrillo¹, F. Forese¹, C. Venturi¹, L. Bianchi¹, R. Lari¹

¹Osp. Ss Cosma e Damiano, ASL3 Pistoia

La trombofilia può essere definita un disordine della coagulazione che contribuisce ad una predisposizione alla trombosi. Tale patologia può essere conseguenza di caratteri acquisiti ed ereditari o di cause genetiche. La ricerca dei polimorfismi di un singolo nucleotide (SNPs) può essere pertinente nella diagnosi di trombofilia ereditaria se richiesta in modo adeguato (1).

Obiettivo. Scopo di questo studio è valutare l'appropriatezza delle indagini di biologia molecolare (BM) richieste nello studio della trombosi venosa profonda (TVP).

Metodi. Dei 280 pazienti analizzati dal gennaio 2002 al marzo 2005 sono stati presi in considerazione le seguenti indagini: 1) mutazione G1691A del fattore V (variante di Leyden); 2) mutazione G20210A del fattore II; 3) mutazione C677T dell'enzima metilen-tetraidrotfolato-riduttasi (MTHFR). I tre SNPs sono stati rilevati con metodica PCR e impiego di enzimi di restrizione (ditta Diatech); 4) proteina C (PC, test cinetico, Dade Behring); 5) proteina S (PS, test Sysmex); 6) omocisteina (HCY, metodo immunologico a fluorescenza con luce polarizzata, Abbott).

Risultati. Tutti i pazienti considerati hanno eseguito la PC, la PS, l'HCY; il 53% (150/280) la ricerca del SNP G20210A e il 20% (56/280) la ricerca del SNP G1691A. Il 46% dei pazienti (130/280) hanno eseguito la ricerca del SNP C677T anche se solo il 9% (26/280) presentavano livelli di HCY alterati. I pazienti con resistenza alla PC attivata (32/280) hanno effettuato sempre la ricerca del SNP G1691A. Mettendo in correlazione SNP C677T con la PC è risultato che il 55% (6/11) dei pazienti con PC alterata presentavano la mutazione in omozigosi e il 36% (4/11) in eterozigosi, nonostante i livelli plasmatici non patologici di HCY.

Conclusioni. I dati analizzati indicano che le richieste di indagini di BM sono in linea di massima in accordo con i protocolli per lo studio della trombofilia eccetto che per la richiesta della mutazione C677T che viene eseguita spesso in assenza di livelli di HCY alterati. Il significato della correlazione di tale mutazione con l'alterazione della PC rimane da indagare: casualità?

Bibliografia. League S., Hooper W.C. Molecular diagnostics of inherited thrombosis. Clin Lab Sci. 2005;18(4):271-9.

058

D-DIMERO E MONITORAGGIO ANTI-TVP DOPO CHIRURGIA ORTOPEDICA MAGGIORE ARTI INFERIORI

K. Bosio¹, E. Vinai¹, G. Troglia¹, F. Di Matteo¹

¹Lab analisi Stella del Mattino RRF Il liv, Fondazione Orizzonte Speranza-Onlus

Obiettivi. Dimostrare utilità del test DD per diagnosi di TVP (trombosi venosa profonda) e TEP (embolia polmonare) e per adeguare profilassi con Eparine dopo chirurgia ortop magg arti inf (1,2) che determina DD elevato nel 97% dei p.; un v n esclude evento in atto (val preditt neg 98%; sensib/specificità 95-100%) (3, 4), soglia di normalità corretta in funzione dell'età (5). Confermare predittività del DD con esito di Ecodoppler.

Metodi. Dal 1/5/2000 al 31/03/2006 ai 2611 p ricoverati in riabilitazione intensiva dopo chirurgia ortop a 8-10 gg dall'intervento, si sono eseguiti 3456 test DD (ELFA VIDAS BioMérieux).

Risultati. I p avevano DD con valori da 1200 a > 10000 ng/ml, oltre i v.n. e correlabili con recente chirurgia (p<0,01). Sono stati suddivisi nelle seguenti fasce: 0-2500 (1733 test); 2501-5000 (1417 test); 5001- >10000 (306 test). I p erano in profilassi con Eparina calcica fino al 02/2004, poi Eparine bpm, Enoxaparina o Reviparina per più favorevole rapporto anti-Xa/IIa, x 3 o + sett, a dose sec DD, peso, clinica; quindi Defibrotide o Sulodexide x 1 mese + ASA 100mg x 2 mesi. Ripetuto DD a 3 sett in 845 p con decremento del 20-50%. 416 p con valori di DD>4000, sintomi TVP, Score Wells>3 (6) e fattori di rischio (Obesità, DM, Varici, >Omocist), sono stati sottoposti ad Ecodoppler venoso AA.ii., risultato positivo per TVP (=15,6%) in 65. Di questi 7 avevano DD <2500, 13 tra 2501 e 5000 (riscontro eco di trombi non recenti) e 45 >5000 (4,7). Correlazione significativa con p<0,01 tra esito positivo per TVP dell'Ecodoppler e DD >5000. A questi p si è posta TAO (INR tra 2 e 3) con ritorno del DD a vn e soluzione del trombo in 3-6 mesi.

Conclusioni. Il DD è il test più affidabile ed economico x condurre corretta profilassi delle TVP dopo Chir Ortop magg Arti inf.

Bibliografia. Lippi G. Blood Coag Fibrin 2006; 17(1):87-88. Peetz D. Thromb Res 2000 Jun 15; 98(6):473-83. Perrier A. Lancet 1999;353:190-195. 4) Shiota N. J Orthop Sci 2002;7(4):444-50. Lowe GDO. ThrombHaemost 1997;78(1):47-52. Wells PS. Lancet 1997;350:1795-1798. Troglia G. Bioch Clin 2004;28(1):93.

059

FACTOR V LEIDEN AND THE PROTHROMBIN G20210A MUTATION ARE RISK FACTORS FOR ARTERIAL OCCLUSIVE DISEASE

N. Botto¹, S. Manfredi¹, C. Federici¹, I. Foffa¹, J. Gianetti¹, M. G. Andreassi¹

¹Laboratory of Cellular Biology and Genetics, CNR-Institute of Clinical Physiology, G. Pasquinucci Hospital, Massa, Italy

Background. The association between the gene mutations of factor V (FVL), prothrombin (FII G20210A) and venous thromboembolic events is widely accepted. However, the role of inherited prothrombotic conditions in arterial thrombosis is not well established.

Aim. To investigate the prevalence of FVL, FII G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms in patients with arterial occlusive disease (AOD) before the age of 55 years.

Methods. We studied 139 patients (78 male, 43.5±9.2 years) with an episode of AOD: cerebral ischemia (n=103), acute coronary syndrome (n=29), peripheral artery disease (n=2), two different atherothrombotic events (n=5) and 91 healthy control subjects (36 male, 41.6±9.7 years) individually matched for age. FVL, FII G20210A and MTHFR C677T were simultaneously evaluated by a system based on allele-specific hybridizations of a PCR multiplex product.

Results. There were no significant differences in the frequency of the MTHFR C677T variant between patients and controls (p=0.8). The prevalence of the FVL and FII 20210A variant was different between two groups (Table). After adjustment for traditional risk factor, the presence of a prothrombotic defect (FII 20210A or FVL) remains an independent risk factor for AOD [OR=8.1 (95% CI, 1.0 to 66.1) p=0.01].

Conclusions. Our data indicate that FV Leiden and FII 20210A variant may predispose to an increased risk of AOD in patients <55 years. Accordingly, genetic screening for risk of thrombosis should be performed in young patients who develop acute arterial thrombosis.

Reference. Federici C et al. Genomic medicine and thrombotic risk: who, when, how and why? *Int J Card* 2006;106:3-9.

	Patients	Controls	χ ²	p
FV Leiden, n (%)			1.3	0.2
Allele Arg	137 (98.6)	91 (100)		
Allele Gln	2 (1.4)	0		
FII G20210A, n (%)			8.3	0.01
Allele G	129 (92.8)	90 (98.9)		
Allele A	10 (7.2)	1 (1.1)		

060

PERSONAL OR FAMILY HISTORY OF THROMBOSIS IS A STRONG INDICATOR FOR PROTHROMBOTIC MUTATIONS SCREENING IN WOMEN BEFORE HORMONE THERAPY

S. Manfredi¹, M. G. Andreassi¹, N. Botto¹, C. Federici¹, S. Maffei²

¹Laboratory of Cellular Biology and Genetics, CNR-Institute of Clinical Physiology, G. Pasquinucci Hospital, Massa, Italy

²CNR-Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

Background. Estrogens are known to increase the risk of thrombotic events in women. Genetic markers of thrombophilia may modulate the safety and efficacy of oral contraceptives (OC) and hormone replacement therapy (HRT). However, routine genetic screening before hormone therapy is still a matter of debate.

Aim. To evaluate the association between personal or family history and the presence of factor V Leiden (FVL), prothrombin (FII G20210A), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) polymorphisms.

Methods. We included 94 healthy women (41.2±11.7 years) who consecutively attended to our Department before starting hormone therapy. A personal or family history in the parents of early pathological thrombosis was defined as stroke, heart attack, or deep venous thrombosis before 55 years. Multiplex PCR-based assays were used to analyze FVL, FII G20210A, and MTHFR C677T polymorphisms.

Results. Forty-nine women (52.1%) had a personal or family history of early pathological thrombosis. The prevalence of thrombotic polymorphisms was compared in patients with and without personal or family history (Table).

Personal or family history of early pathological thrombosis was significantly associated with the presence of a pro-coagulant mutation (FII 20210A or FVL variants) [OR=6.2 (95% CI, 1.3-29.9) p=0.01].

Conclusion. Our data indicate the screening for FVL and FII 20210A variants might be advisable in the women with personal and family history before starting exogenous hormones.

Reference. Andreassi MG, Botto N, Maffei S. Factor V Leiden, prothrombin G20210A substitution and hormone therapy: indications for molecular screening. *Clin Chem Lab Med* 2006 44:514-21

Genotypes	Positive history	Negative History
FVL, n (%)		
Arg Arg	40 (81.6)	44 (97.8)
ArgGln	9 (16.3)	1 (2.2)
GlnGln	1 (2.0)	/
FII G20210A, n (%)		
GG	46 (93.9)	44 (97.8)
GA	3 (6.2)	1 (2.2)
AA	/	/
MTHFR C677T, n (%)		
CC	15 (30.6)	9 (20)
CT	19 (38.8)	23 (51.1)
TT	15 (30.6)	13 (28.9)

061

COUMADIN O SINTROM? ALCUNE PICCOLE DIFFERENZEE. Cancellieri¹, L. Soloni¹¹Dipartimento di Patologia Clinica. Centro per la diagnosi e la cura delle malattie della coagulazione. A.O. Ospedale Maggiore di Crema (CR)

Introduzione. Il Centro di Terapia Anticoagulante Orale dell'A.O. Ospedale Maggiore di Crema segue attualmente 800 pazienti, 500 in terapia con warfarin (COUMADIN) e 300 con acenocumarolo (SINTROM).

Scopo del Lavoro. Per valutare sul campo quale dei 2 farmaci ottiene le migliori performance in termini di numero totale di visite di controllo, % di controlli in range, minori fluttuazioni dei fuori range, abbiamo monitorato l'andamento dell'INR in 200 pazienti suddivisi in 2 gruppi (100 pazienti assumevano warfarina e 100 acenocumarolo) per un periodo di 2 anni. Tutti i pazienti, sovrapponibili per età sesso e patologia, richiedevano un target di anticoagulazione di 2,5.

Risultati. Non abbiamo riscontrato una differenza statisticamente significativa tra i pazienti trattati con warfarin e quelli con acenocumarolo per quanto riguarda il numero medio di visite/paziente/anno ($n=18$). La percentuale dei PT in range terapeutico era 63% per il Sintrom e 65% per il Coumadin; un aumento significativo dei controlli in range, per entrambi i farmaci, si otteneva solo a partire dal 2° semestre ($t=3,2511$ $p<0,01$). La percentuale di controlli fuori range evidenziava un numero maggiore di INR < 2 nei pazienti trattati con warfarin. Fluttuazioni dell'INR > 4.5 erano rappresentate più significativamente nei pazienti in Coumadin rispetto a quelli in Sintrom, limitatamente al primo semestre di trattamento.

Discussione. I nostri dati non individuano sostanziali differenze tra i due farmaci per quanto riguarda il numero di controlli/paziente/anno e la percentuale di controlli in range; evidenziano una maggiore instabilità dei valori di INR nei primi sei mesi di trattamento e, per i pazienti in Coumadin, una tendenza all'ipercoagulabilità nel primo semestre, significativamente maggiore rispetto ai pazienti in Sintrom. Le variazioni dell'INR sopra il range terapeutico sembrano essere maggiori per i pazienti anticoagulanti con warfarin, ad indicare quindi un aumento del potenziale rischio emorragico, non così ugualmente espresso nei pazienti anticoagulati con acenocumarolo.

Bibliografia. Lengyel M; SPORTIF-III Altanulmany Vizsgaloi. Warfarin or acenocoumarol is better in the anticoagulant treatment of chronic atrial fibrillation? *Orv Hetil.* 2004 Dec 26;145(52):2619-21

062

STUDIO DEI FATTORI DELLA COAGULAZIONE IN UN CASO DI COAGULAZIONE INTRAVASCOLARE DISSEMINATAP. Carraro¹, H. Afshar², B. Fonesu², N. Di Vitofrancesco², M. Plebani²¹Lab. di Patologia Clinica, Osp. S. Antonio, ULSS16 Padova²Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università, Padova

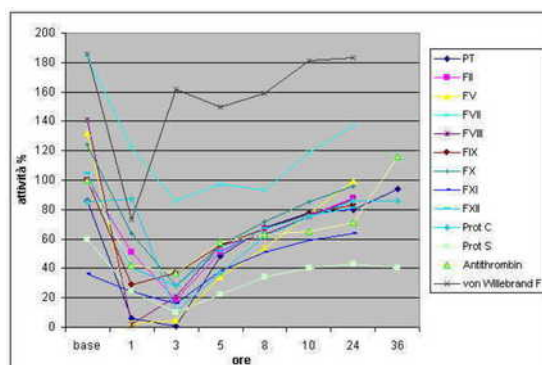
L'evoluzione temporale del consumo dei fattori della coagulazione durante la Coagulazione Intravascolare Disseminata (CID) non è ben conosciuta.

Presentiamo il caso di CID acuta in una gravida di 32 anni alla 34° settimana con "placenta previa". La paziente, ricoverata in buone condizioni per un parto cesareo programmato, ha manifestato un'emorragia incontenibile ed il riscontro di sofferenza fetale. Si è proceduto ad un intervento urgente con la nascita di un bambino vitale. Dopo 2 ore le condizioni cliniche peggioravano con un quadro di sanguinamento, atonia uterina e CID grave conclamata. Si è quindi proceduto ad una isterectomia urgente. In queste fasi sono state somministrate unità di sangue, plasma fresco e piastrine. Dopo 2 giorni di trattamento intensivo la paziente, migliorata, è stata trasferita in reparto ostetrico.

Prelevi di sangue per esami di laboratorio sono stati eseguiti prima dell'esordio e poi a 1, 3, 5, 8, 10, 24, 36 ore dal sanguinamento iniziale per la determinazione di parametri coagulativi. Il Laboratorio ha potuto tempestivamente completare gli esami di diversi fattori. Dopo 1 e 3 ore numerosi test erano depressi, in particolare i fattori I, II, VIII, X, XI, XII, la Proteina C, l'Antitrombina ed il PT. I più precoci, con spiccata riduzione ad 1 ora, erano il fattore V, VIII e il PT. Il conteggio piastrinico ha mostrato una riduzione tardiva. Il fattore di von Willebrand e il fattore VII sono rimasti entro livelli normali.

In questo caso i test più precoci ed utili nel riconoscimento della CID sono stati: PT, Fibrinogeno, fattore V e VIII, proteina C.

Taylor FB et al. *Thromb Haemost.* 2001 Nov;86(5):1327-30



063

CONFRONTO TRA PROVETTE DI VETRO E DI PLASTICA PER IL TEMPO DI PROTROMBINA IN PAZIENTI IN TAO

D. Cosseddu¹, C. Marchese¹, R. Levo¹, R. M. Marmetto¹, I. Canta¹, G. C. Molinaro¹

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, ASO Ordine Mauriziano, Torino

Scopo. Determinare l'affidabilità delle provette in plastica per il tempo di protrombina nei pazienti in TAO, alla luce di recenti studi che invece dimostrerebbero una sottostima dell'INR tale da poter influenzare la strategia terapeutica. Materiali e Metodi. Lo studio ha coinvolto 172 pazienti in TAO presso il nostro Centro FCSA a cui sono state prelevate una provetta in plastica (BD vacutainer 2.7 ml, 3.2% citrato) e una in vetro (BD vacutainer 4.5 ml, 3.2% citrato). Le provette sono state poi indirizzate allo strumento (STA-RAC, Roche) dopo adeguata centrifugazione per 10 minuti a 3200g. Le provette sono state inserite nello strumento per eseguire l'INR entro 20 minuti dal prelievo. Dopo due ore circa l'INR è stato eseguito nuovamente in entrambe le provette. Sono stati anche studiati 26 soggetti normali.

Risultati. Abbiamo deciso di suddividere i risultati in due tabelle a seconda del tipo di soggetti studiati

Tabella II. Tempo II. Soggetti Normali (26 soggetti)

Vetro Plastica p (test t di student)

INR (M ± SD) 1.02 ± 0.05 1.02 ± 0.05 0.4036

INR dopo due ore (M ± SD) 0.97 ± 0.06 0.96 ± 0.06 <0.0005

p (test t di student) <0.0005 <0.0005

Tabella III. Tempo II. Pazienti in TAO (172 pazienti)

Vetro Plastica p (test t di student)

INR (M ± SD) 2.64 ± 1.07 2.62 ± 1.02 0.0016

INR dopo due ore (M ± SD) 2.68 ± 1.14 2.66 ± 1.11 0.0051

p (test t di student) 0.0010 0.0010

Conclusioni. L'INR nelle provette in plastica risulta dal punto di vista statistico significativamente più basso di quello misurato nelle provette in vetro sia nei pazienti in TAO che in soggetti normali; tale differenza non risulta tuttavia clinicamente significativa e cioè tale da indurre errori terapeutici, visto che non supera in nessun caso il 10% considerato limite massimo accettabile

Bibliografia. Flebig WE, Ezzell JE, Ng VL. Clinically relevant differences in prothrombin time and INR values related to blood sample collection in plastic vs glass tubes. Am J Clin Pathol 2005; 124: 902-9.

064

QUALI E QUANTI TEST PER L'ANTICOAGULANTE LUPICO?

D. Cosseddu¹, C. Marchese¹, R. Levo¹, R. M. Marmetto¹, I. Canta¹, G. C. Molinaro¹

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, ASO Ordine Mauriziano, Torino

Scopo. Determinare la performance di 4 test di coagulazione per la ricerca del lupus anticoagulant (LA) e la loro relativa incidenza nei soggetti positivi.

Materiali e Metodi. Sono stati inseriti nello studio 240 campioni per la ricerca del LA provenienti da 201 pazienti (38 M, 163 F) di età media di 45.1 anni. In tutti i campioni sono stati eseguiti come screening APTT (Stago Roche APTT-STACLOT LA), DRVVT (LAC screen, IL), KCT (home made) e SCT (SCT screen, IL); sono stati quindi seguiti i criteri proposti dal SSCISTH. Nel caso del DRVVT e del SCT i test di conferma erano all'interno dello stesso kit.

Risultati. I pazienti sono stati suddivisi in diversi gruppi a seconda del test risultato positivo secondo lo schema seguente: 1) Positivo solo per DRVVT 17 (7.1%); 2) Positivo solo per STACLOT LA 28 (11.7%); 3) Positivo per tutti e 4 i test 76 (31.7%); 4) Positivo per STACLOT LA e DRVVT 21 (8.8%); 5) Positivo per STACLOT LA, SCT e KCT 35 (14.6%); 6) Positivo per SCT e KCT 46 (19.2%); 7) Positivo per DRVVT, SCT e KCT 14 (5.8%); 8) Positivo per DRVVT e SCT 1 (0.4%); 9) Positivo solo per KCT 1 (0.4%); 10) Positivo solo per SCT 1 (0.4%).

Quindi è stato possibile calcolare la positività rispetto ad ogni test: DRVVT 129/240 (53.8%); STACLOT LA 160/240 (66.7%); SCT 173/240 (72.1%); KCT 172/240 (71.7%).

Conclusioni. I risultati di questo studio suggeriscono che a) SCT e KCT hanno un comportamento diagnostico sovrapponibile (solo 3/240 test hanno risultato diverso); b) SCT e KCT identificano il maggior numero di pazienti con positività LA (71.7% e 72.1% rispettivamente); c) la decisione di eseguire solo due test (come indicato dalle linee guida) avrebbe causato la mancata diagnosi di almeno il 7.5% dei campioni LA positivi (rinuncia a DRVVT e KCT) con un massimo del 20.0% (rinuncia a SCT e KCT); d) sembra quindi consigliabile eseguire più di due test di screening per la ricerca del LA

Bibliografia. Miyakis S, Loskshin MD, Atsumi T et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 2006;4:295-306.

065

LIVELLI DI OMOCISTEINA PLASMATICI IN UNA COORTE DI PAZIENTI ITALIANI HIV POSITIVI

G. Di Iorio¹, G. Parruti², G. Marani Toro², R. Florindi¹, A. D'Amico¹, E. Patriarca¹, E. Piattelli¹, G. Odorisio¹, G. Riario Sforza¹

¹Laboratorio Analisi Ospedale Spirito Santo Asl Pescara

²Malattie Infettive Ospedale Spirito Santo Asl Pescara

Scopo. Valori elevati di HCY rappresentano un fatt. di rischio indipendente per lo sviluppo e la progressione del danno vasc. aterotrombotico, inoltre, un rilevante numero di indizi suggeriscono che anche moderati aumenti dei livelli plasmatici di HCY possano scatenare il danno vascolare. Nonostante la recente dimostrazione dell'incremento del rischio cardio vasc. per i pz. HIV infettati riceventi HAART, lavori sui livelli di HCY nei pz. HIV infettati sono scarsi.

Metodi. Abbiamo misurato i livelli di HCY totale utilizzando "IMX HCY SYSTEM" della ditta ABBOTT che utilizza un dosaggio immunologico a fluorescenza con luce polarizzata Tra l'Ott. 04 ed il Feb. 05, 105 (89.7%) dei 117 pz. in HAART nel servizio di DH- M. Infettive sono stati testati così come 25 pz. HIV infetti non trattati e 60 donatori sani locali accostati per età sesso durata dell'infezione, livello della malattia, schema dell' HAART, tolleranza dell'HAART, risposta immune all'HAART, valori di colesterolo e trigliceridi sono stati valutati per la possibile associazione con i livelli di HCY.

Risultati. La media dei valori di HCY è stata 15.04 +/- 7.9 mmol/L nei pz. HIV in schema HAART , 13.08 +/- 8 mmol/L nei pz. HIV non trattati e 10.9 +/- 5.1 mmol/L nei controlli sani (p < 0.01). Iperomocisteinemia è stata rilevata nel 54.4 % dei maschi trattati contro il 23.3 % dei controlli ed il 26.7% delle femmine trattate contro il 6.7% dei controlli (p < 0.01). Pz. con scarsa risposta immune allo schema HAART (CD 4 + T cell < 200/u/L) avevano significativi bassi livelli di HCY plasmatici (p < 0.05), laddove pz. in schema NNRTI rispetto a regimi HAART hanno mostrato una tendenza a livelli più bassi di HCY Conclusioni. I nostri risultati suggeriscono che aumenti dei valori di HCY plasmatici possano essere frequenti tra i pz. HIV in schema HAART. Così come un incremento del rischio cardiovascolare possa minacciare l'efficacia dello schema HAART, sarebbe pertanto auspicabile un approfondimento delle conoscenze sulla prevalenza e la predittività dell'iperomocisteinemia in questo tipo di pz..

Bibliografia. Clarke R., et.al. Hyperhomocysteinemia : an independent risk factor for vascular disease. N. Engl. J. Med. 1991; 324: 1149-55.

066

DOSAGGIO DEL FATTORE VIIIc: INDICATORE DI QUALITA' PER LA VALIDAZIONE DI UNITA' DI PLASMA FRESCO CONGELATO

A. Giani¹, S. Avigni¹, F. Gioia¹, G. Martinelli², G. Crovetto²

¹Lab. Analisi Ospedale di Circolo di Busto Arsizio

²SIMT Ospedale di Circolo di Busto Arsizio

I fattori labili della coagulazione, in primo luogo il fattore VIIIc (FVIIIc), glicoproteina plasmatica ad attività procoagulante, sono presenti funzionalmente attivi nel Plasma Fresco Congelato (PFC), emocomponente ad uso trasfusionale, per la terapia sostitutiva nei deficit multipli dei fattori della coagulazione.

Scopo. Nel PFC, qualunque sia il processo produttivo (frazionamento da unità di sangue intero o da aferesi) deve essere presente una concentrazione di FVIIIc > 0,7 UI/ml (1). Pertanto il dosaggio del FVIIIc nel PFC scongelato rappresenta l'analisi di riferimento nel controllo di qualità (CQ) dell'intero processo produttivo: frazionamento, congelamento rapido a -30°C, crioconservazione, scongelamento a +37°C.

Materiali e Metodi. Campioni di PFC ottenuti da frazionamento manuale o da aferesi congelati a -30°C entro 6 ore dal prelievo, conservati in congelatore meccanico a -80°C, rapidamente scongelati a +37°C.

Dosaggio con Factor VIII deficient plasma-HemosILTM (Ditta IL, Milano): plasma umano immunodepleto di Fattore VIII per la determinazione quantitativa dell'attività del fattore VIII mediante l'esecuzione di tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) modificato. sullo strumento ACL ADVANCE (Ditta IL - Milano), apportando opportune modifiche della curva di calibrazione del dosaggio, per discriminare meglio le concentrazioni nell'ambito dei valori normali di FVIIIc.

Risultati Preliminari.

N° unità analizzate: 98

Valore minimo di FVIIIc: 0.42 UI/ml

Valore massimo di FVIIIc: 1.56 UI/ml

% di unità non idonee: 11%

Origine delle unità non idonee: prelievo difficoltoso, presenza di microaggregati, tempo di procedura di produzione superiore a 6 ore, temperatura del processo non costante, stato del donatore.

Conclusioni. L'introduzione, nel controllo di qualità del SIMT, del dosaggio del FVIIIc su un numero predefinito di unità di plasma prodotte, è utile per garantire l'efficacia clinica dell'emocomponente PFC e risponde all'esigenza di monitorare, nella sua interezza, il processo produttivo dell'emocomponente.

Bibliografia. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation No. R(95) 15. 12th edition. Council of Europe Publishing.

067

ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODY TESTING IN PIEMONTE AND VALLE D'AOSTA: A MULTILABORATORY EXTERNAL QUALITY ASSURANCE PROGRAM

B. Montaruli¹, D. Frezet², P. R. Ghignone², G. Mengozzi², D. Cosseddu³, P. Napoli¹, R. Pagni⁴, M. Saitta⁵, M. Bazzan⁶

¹UOA Laboratorio Analisi, POEV ASL-1, Gruppo Regionale per lo Studio della Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi, Torino

²Laboratorio Analisi ASO San Giovanni Battista, (GAL) Gruppo di Autoimmunità di Laboratorio Piemonte e Valle d'Aosta, Torino

³Laboratorio Analisi ASO Mauriziano, Gruppo Regionale per lo Studio della Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi, Torino

⁴Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ASO San Giovanni Battista, Torino

⁵UOA Laboratorio Analisi, POEV ASL-1, Torino

⁶Divisione di Ematologia e Malattie Trombotiche, Humanitas Cellini, Gruppo Regionale per lo Studio della Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi, Torino

Antiphospholipid antibodies (aPL) screens are frequently ordered in the workup of thrombophilic patients or women with fetal loss. Recently the revised classification criteria for aPL syndrome (APS) has been published. Both lupus anticoagulant (LA) and IgG and IgM anticardiolipin (aCL) are maintained as laboratory APS criteria, and IgG and IgM anti β 2-glycoprotein-I (a β 2Gpl) assays are added in the revised criteria. The sensitivity and specificity of LA, IgG and IgM aCL and IgG and IgM a β 2Gpl detection vary depending on the choice of tests, cutoff values, and results interpretation. This variation is detrimental because persistent laboratory aPL positivity in patients with history of thrombosis is a requisite for long-term anticoagulant therapy.

Aim of this study is to investigate differences in LA, aCL and a β 2Gpl testing and reporting practices among diagnostic laboratories of Piemonte and Valle d'Aosta. A survey of 5 plasmas to screen for LA and 5 sera to screen for aCL and a β 2Gpl was sent to all 15 laboratories enrolled for aCL and a β 2Gpl testing and to all 16 laboratories enrolled for LA testing. The following information was requested to each participating center: manufacturer/type of assays; isotype tested; values used to define negative/positive and semi/quantitative cut offs and how they were determined; whether interpretative comments were provided and their content.

Moreover, as suggested by the guidelines, to optimize standardization of aCL and a β 2Gpl two reference samples (monoclonal Sapporo Standard Antibodies HCAL and EY2C9) were introduced as positive internal quality controls for aCL and a β 2Gpl testing. Registrants are required to report their antibody results value in term of related Sapporo Standard value and also in routinely reported units. Finally, in order to evaluate the usefulness of the Sapporo's antibodies to express the results as related standards values in the standardization of aCL and a β 2Gpl ELISA assays, we are going to screen 75 samples with 5 different aCL and 5 different a β 2Gpl commercial kits.

068

MONITORAGGIO DELLA TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE: ORGANIZZAZIONE E TURNAROUND TIME

M. Nicoli¹, R. Facchinetti¹, P. Rizzotti¹

¹Lab. di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Centro FCSA 186, Osp. Civile Maggiore, Verona

Scopo del lavoro. Valutare l'effetto di cambiamenti organizzativi e logistici nel nostro Servizio di Sorveglianza della Terapia Anticoagulante Orale (TAO) sul Turnaround Time (TAT) del monitoraggio terapeutico.

Nel nostro Centro, grazie alla recente disponibilità di nuove strutture dedicate (sala d'attesa ed ambulatorio) e ad un opportuno adeguamento del sistema informatico, è stata modificata la modalità di consegna ai Pazienti degli schemi terapeutici. Prima della riorganizzazione la consegna dei referti veniva fatta a un orario prefissato (ore 10 am). Dopo la riorganizzazione la consegna dei referti avviene a ciclo continuo non appena disponibile il risultato del Tempo di Protrombina (PT).

Materiali e Metodi. Abbiamo monitorato per 5 giorni il TAT dal momento dell'accettazione amministrativa del Paziente fino alla consegna del referto del PT e dello schema terapeutico, prima e dopo la riorganizzazione.

Abbiamo inoltre misurato l'affollamento della sala d'attesa prima e dopo la riorganizzazione.

Risultati. Prima della riorganizzazione: TAT medio 121 minuti (da 75 a 165).

Numero di persone presenti in sala d'attesa al momento della consegna: media 52.

Dopo la riorganizzazione: TAT medio 45 minuti (da 40 a 50).

Numero massimo di persone presenti in sala d'attesa: media 31.

Considerazioni Conclusive. Un lungo tempo di attesa è un parametro valutato soggettivamente dai Pazienti come negativo, e fonte di disagio a causa del conseguente sovraffollamento degli spazi fisici. Una riduzione del TAT migliora la qualità di vita degli utenti e decongestiona le sale d'attesa. Inoltre può contribuire a risolvere indirettamente altri problemi logistici legati ad esempio ai tempi massimi di parcheggio delle automobili, agli impegni di eventuali accompagnatori dei Pazienti, alla necessità di assumere cibo e farmaci.

Bibliografia. Valenstein P. Laboratory Turnaround Time. A. J. C. P. 1996;105:676-88

069

VALUTAZIONE DEL CQI TRA STRUMENTI DI ROUTINEL. Bassi¹, R. Lupi¹, L. Comelini¹, S. Rizzardi¹¹Laboratorio Analisi, Azienda Istituti Ospitalieri, Cremona

Scopo. Scopo del nostro lavoro è stato verificare e confrontare le performance analitiche di due analizzatori Modular P/P, presenti nel nostro laboratorio in routine nell'esecuzione del CQI.

Materiali e Metodi. Sono stati valutati i controlli Precinorm U e Precipath U giornalieri degli analiti di chimica clinica normalmente eseguiti durante la routine su due analizzatori MODULAR P/P (MOD A e MOD U) in dotazione dal 2000 ed installati in routine dal mese di gennaio 2005. In precedenza uno era utilizzato nel settore di urgenza e non eseguiva esami di routine. I valori di CV mensili sono confrontati con il goal analitico (CV<0.5CVi) dopo inserimento su un foglio di Excell che, automaticamente, evidenzia il superamento o meno del parametro. I dati raccolti hanno evidenziato un mancato raggiungimento del traguardo analitico per Ca, Cl, Mg, Na, PT, Alb, Creatinina per entrambi gli strumenti, con una migliore performance per MOD U.

Valutando come traguardo analitico la prestazione minima, MOD U rientra nei parametri d'accettabilità per PT, mentre entrambi gli strumenti se si considera l'ETA.

Si sono poi confrontati i CV calcolati con quelli ottenuti dalla media omogenea dei risultati della VEQ Lombardia anno 2005. I dati riguardano 12 campioni di controllo eseguiti da 80 laboratori. I CV calcolati dalla media omogenea, da noi considerati come "CV stato dell'arte", sono stati confrontati con i nostri CV, ma solo per quegli analiti per cui non avevamo raggiunto il 100% di risposte nei limiti d'accettabilità previsti dalla Regione (7 risposte su 12).

Analita

NA: CV stato dell'arte 1,75; CV MOD 1 1,1; CV MOD 2 0,7;

Cl: CV stato dell'arte 3,16; CV MOD 1 1,3; CV MOD 2 1,1;

Ca: CV stato dell'arte 3,51; CV MOD 1 2,3; CV MOD 2 1,6.

Conclusioni. I dati raccolti hanno confermato la difficoltà generale per il raggiungimento di alcuni dei traguardi analitici. La valutazione dello stato dell'arte può aiutare a meglio valutare il livello di prestazioni analitiche degli strumenti, confrontandosi con la realtà più estesa d'altri laboratori che utilizzano il medesimo sistema e metodo analitico.

070

FASE PRE-ANALITICA: MONITORAGGIO DEGLI ERRORIA. D'Osualdo¹, A. Romice¹, C. Pozzato¹, G. Chino¹, G. Vecchiato¹, L. Sciacovelli², M. Plebani¹¹Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università, Padova²Centro Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

L'identificazione degli errori di laboratorio rappresenta un aspetto fondamentale per la valutazione ed il miglioramento della qualità.

Scopo di questo lavoro è valutare l'efficacia degli indicatori applicati alla fase di accettazione del paziente ambulatoriale. In particolare sono analizzati i dati raccolti relativamente a: anagrafica del paziente ed esami richiesti (non eseguito, eseguito per errore, misinterpretato); irregolarità del campione (scorretto, insufficiente, non pervenuto, coagulato) che comportano un nuovo accesso del paziente.

Gli errori sono stati identificati mediante verifica a campione: a) per quanto riguarda la richiesta, mediante il confronto fra richiesta e foglio generato all'accettazione; b) per quanto riguarda i campioni, su segnalazione del personale addetto alla verifica dei campioni dopo il prelievo.

In tabella sono riassunti i risultati riscontrati negli ultimi anni.

I risultati dimostrano che l'errore inerente il campione risulta contenuto mentre, per il 2005, si riscontra un incremento relativo all'accettazione, riconducibile principalmente all'introduzione di personale di nuova assunzione. Si è evidenziato infatti che, nonostante la formazione attuata prima dell'entrata in servizio, il personale mostrava difficoltà nell'interpretazione di alcuni esami, specialmente nel caso di richieste scritte a mano. Al fine di risolvere le cause di errore, sono stati attuati diversi incontri focalizzati sui test che avevano indotto ad errata interpretazione.

Il dato, che risulta diminuito nel 2006, dimostra che il continuo monitoraggio degli errori è fondamentale per individuare aree critiche necessarie di interventi correttivi.

ERRORI	ANNO					
	2001	2002	2003	2004	2005	2006*
Accettazione						
- anagrafica (%)	0,29	0,14	0	0	0	0,02
- esami (%)	0,78	0,61	0,87	1,3	2,19	0,83
- altri	0,04	0,19	0,46	0	0,26	0,22
Totale (%)	1,14	0,95	1,18	1,3	2,45	1,7
Totale accettazioni controllate	4029	2099	4734	2248	6060	4945
Paz. richiamati (%)			0,11	0,10	0,07	0,06

*dati fino a maggio 2006.

071

UTILIZZO DELLO STRUMENTO AGREE NELLA VALUTAZIONE DI UNA LINEA GUIDA: NOSTRA ESPERIENZA

R. Faricelli¹, I. Cataldo¹

¹Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale CLinicizzato SS Annunziata, Chieti

Scopo del lavoro. Lo strumento AGREE fornisce una valutazione della validità di una linea guida. Nel nostro lavoro abbiamo applicato lo strumento AGREE nel valutare due linee guida proposte in un corso ECM aziendale sull'Evidence Based Medicine. La prima linea guida è quella sulle malattie autoimmuni, la seconda sulle malattie cardiovascolari.

Materiali e Metodi. Lo strumento AGREE consiste di 23 criteri (item) suddivisi in 6 aree. Gli item 1-3 riguardano obiettivi e motivazione, 4-7 il coinvolgimento delle parti in causa, 8-14 il rigore della elaborazione, 15-18 la chiarezza e presentazione, 19-21 l'applicabilità, gli ultimi due 22-23 all'indipendenza editoriale. Si calcolano dei punteggi (score da 4 a 1) per ogni singola area, sommando poi gli score dei singoli item che la compongono e standardizzando il totale come percentuale del punteggio massimo possibile per quell'area. Alla fine dello strumento di valutazione è presente un giudizio complessivo sulla linea guida. I gruppi sono stati 4 costituiti ciascuno da 15 persone.

Risultati. I due gruppi valutatori hanno applicato lo strumento AGREE sulla linea guida per le malattie autoimmuni ed abbiamo ottenuto per l'item 1-3 il 100%, per il 4-7 il 54,1%, per l'8-14 66%, per il 15-18 il 83,3%, il 19-21 non valutabile, item 22-23 non valutabile. Gli altri due gruppi di valutatori ha applicato AGREE alla linea guida per le malattie cardiovascolari si è ottenuto l'88% item 1-3, 48% item 4-7, 47,6% item 8-14, 54,1 item 15-18, 44,4% item 18-21, 33,3% item 22-23. Tutti e due i gruppi hanno dato lo stesso giudizio complessivo.

Conclusioni: Le due linee guida considerate hanno una percentuale più alta nei primi 5 punti dell'AGREE. Le percentuali si sono abbassate negli ultimi 2 punti, applicabilità e indipendenza editoriale. Da segnalare positivamente il giudizio complessivo unanime dei due gruppi: per quanto riguarda le linee guida per le malattie autoimmuni è stato espresso il "perfetto accordo"; per quanto riguarda le linee guida delle malattie cardiovascolari è stato espresso all'unanimità "si raccomanda (con riserva)".

072

L'ESAME URINE E LA PROTEINURIA: NECESSITA' DI STANDARDIZZAZIONE DELLE METODICHE PER MIGLIORARE LA QUALITA' DEI RISULTATI. STUDIO BASATO SU UN QUESTIONARIO INVIATO AI LABORATORI DELLA REGIONE PIEMONTE

M. Gai¹, G. Lanfranco¹

¹Laboratorio di Nefrologia – SCU Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Ospedale Molinette, Torino

²*A nome della SIBioC, sezione Piemonte

Nel 2005 su iniziativa della sezione Piemonte della SIBioC è stato istituito un gruppo di studio sull'esame urine e proteinuria con lo scopo di affrontare i principali problemi di standardizzazione delle metodiche. Per fare questo si è pensato di partire dalla valutazione della situazione attuale dei laboratori piemontesi con un questionario a risposte multiple che è stato inviato ai responsabili dei laboratori pubblici del territorio piemontese.

Le risposte ci sono pervenute finora da 28 laboratori (74%) su 38 invitati a partecipare al questionario. La maggior parte dei laboratori (24/28) utilizza le prime urine del mattino per l'esame chimico-fisico e microscopico, 4 utilizzano le seconde urine del mattino. Soltanto in 18/28 presidi ospedalieri vengono fornite istruzioni scritte per una corretta raccolta e conservazione dei campioni. Tutti i laboratori utilizzano un lettore automatico per la valutazione delle strisce reattive. 23 centri utilizzano un microscopio in campo chiaro, 5 a contrasto di fase e solo 1 di questi utilizza abitualmente anche il polarizzatore. Sono inoltre stati oggetto di indagine i tempi e le velocità di centrifugazione, il volume finale in cui viene risospeso il fondello, la modalità di refertazione e l'utilizzo del citofluorimetro per la lettura automatizzata del sedimento. Per quanto riguarda la proteinuria solo in 10 laboratori si esegue il dosaggio del rapporto proteinuria/creatininuria. Migliore è invece la situazione per quanto riguarda il dosaggio della microalbuminuria. Il dosaggio delle proteine urinarie viene eseguito con il metodo del Cloruro di Benzetonio in 12 centri, Rosso di pirogallolo in 10, Biureto diretto in 2. Ben il 50% dei laboratori non utilizza un controllo di qualità esterno.

Dalla elaborazione delle risposte si evincono alcuni principi generali: l'utilità di confrontarsi e confrontare il proprio lavoro al fine di avviare una discussione costruttiva che porti a ridefinire i propri protocolli analitici nello sforzo di standardizzare ed uniformare i metodi di analisi e refertazione; la necessità di un gruppo di studio sull'esame urine e sulla proteinuria a livello nazionale che fosse espressione della collaborazione delle varie Società Italiane (Nefrologia, Patologia Clinica, ...).

073

VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ PERCEPITA DALL' UTENTE INTERNO COME STIMOLO PER IL MIGLIORAMENTO DEL SERVIZIO

S. Gelsumini¹, S. Altinier¹, L. Sciacovelli², M. Plebani³

¹Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università, Padova

²Centro Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

³Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università, Padova; Centro Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

Le indagini sulla soddisfazione dell'Utente sono uno strumento importante per individuare le azioni che il laboratorio può intraprendere per migliorare le attività che hanno ricadute sul processo di cura del Paziente.

Scopo di questo lavoro, è presentare i risultati ottenuti relativamente al grado di soddisfazione delle unità operative interne all'Azienda in seguito all'attivazione del Sistema di Informatizzazione per l'accettazione degli esami e la visualizzazione dei referti (Sistema Sanitario Informativo: SSI).

A tal fine è stato stilato un questionario, distribuito al personale infermieristico delle unità operative, che considerasse: eventuali criticità emerse circa l'uso del SSI nel corso del 2005, nonché nel periodo immediatamente successivo al trasferimento del laboratorio nei nuovi locali; conformità del SSI alle esigenze dei singoli reparti; aspetti di competenza e relazionali del Servizio; eventuali suggerimenti.

Sono state raccolte 142 risposte relative a 23 reparti. I dati evidenziano che:

- le persone formate all'uso del SSI sono soprattutto Infermieri (69,5%);
- l'uso del SSI ha introdotto un notevole risparmio di tempo nella fase di accettazione delle richieste (53%);
- i referti sono disponibili presso le unità operative entro le ore 12 (60%) e ciò corrisponde sufficientemente bene alle esigenze di lavoro (75,7%);
- il livello del personale risulta fra buono-ottimo per disponibilità e cortesia (45,8%) e per competenza (57,3%);
- il Servizio risulta migliorato (41,2%) nell'ultimo anno e i reparti non hanno rilevato un calo della sua efficienza nel periodo successivo al trasloco (rimasto uguale-migliorato: 97,5%);
- le interruzioni di collegamento informatico, anche se contenute (inferiori a 5 al mese) e le modalità di trasporto dei campioni all'interno dell'Azienda, rappresentano il principale inconveniente verificatosi;
- il personale ha necessità di ricevere una formazione continua sui Servizi del Laboratorio.

È compito del personale del Servizio identificare gli interventi più opportuni per migliorare le attività gestionali formative, al fine di ottimizzare le prestazioni tecnico-professionali e, di conseguenza, il decorso ospedaliero dei pazienti.

074

PROVE DI RIPETTIVITÀ DELLE DETERMINAZIONI DI GLUCOSIO E POTASSIO

F. Ghiara¹, M. C. Perrone², L. C. Bottaro³

¹N.O. Dip. Pat. Clinica Asl3 Genovese Levante, Nervi

²U.O. Dip. Pat. Clinica Asl3 Genovese Levante

³Resp. Dip. Pat. Clinica Asl3 Genovese

Obiettivo. controllo delle variazioni delle concentrazioni del glucosio e del potassio in campioni di siero conservati in frigorifero.

Materiali e Metodi. Dosaggio del glucosio (metodo esochinasi) e del potassio (elettrodo ad ioni selettivi) su analizzatore Architect c8000 Abbott. La scelta dei campioni utilizzati per la verifica è stata casuale e sono stati utilizzati i sieri della settimana precedente che erano stati conservati in frigorifero a 2-4 °C. Sono stati presi in considerazione solo quei pazienti a cui erano stati determinati i due analiti e i cui campioni non erano emolizzati o torbidi. Sono stati rideterminati i suddetti analiti ed è stata stimata la significatività della differenza fra le due serie di 67 valori (prima e dopo conservazione) mediante la regressione lineare di Passing-Bablok (software Labstat versione 3) sia per la glicemia (mg/dL) sia per il potassio (mmol/L). Inoltre sono stati calcolati i delta fra ciascun analita prima e dopo conservazione e i relativi coefficienti di variazione (CV %).

Risultati. Il coefficiente di regressione lineare relativo alle due successive determinazioni di glicemia è stato di 0,999 e quello relativo ai livelli di potassio è stato di 0,982; entrambi non hanno dimostrato una differenza statisticamente significativa fra le due serie. Tuttavia, mentre i CV% dei valori di glicemia sono apparsi sia positivi che negativi, quelli relativi ai livelli di potassio sono risultati solo positivi. Le variazioni delle glicemie sono risultate entro i range di variabilità analitica certificata fra giorni; al contrario le variazioni di potassio sono apparse superiori alla variabilità interserie.

Discussione. Dai risultati ottenuti, si può dedurre che i livelli di glucosio dopo una settimana di conservazione dei campioni in frigorifero possono essere considerati non solo non significativamente differenti da quelli iniziali, ma entro gli intervalli di variabilità analitica interserie. Invece i livelli di potassio determinati dopo la conservazione dei campioni sono apparsi non significativamente differenti da quelli iniziali, ma il lieve incremento verificatosi è superiore alla variabilità interserie del metodo e può essere attribuito alla fase di conservazione del campione stesso.

075

CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO PER ACTH, C-PEPTIDE E PARATORMONE INTATTO IN ENDOCRINOLOGIA

A. Giani¹, V. Mainini¹, F. Gioia¹, S. Cione¹, D. De Francesco¹

¹Laboratorio Analisi Ospedale di Circolo di Busto Arsizio (VA)

Nel Laboratorio di Endocrinologia, alcuni ormoni più di altri richiedono particolari modalità di prelievo, conservazione ed analisi a causa delle caratteristiche biochimiche intrinseche, della breve emivita e della delicatezza dell'analisi stessa.

Scopo. Valutazione dell'andamento del controllo di qualità interno per ACTH, C-Peptide e Paratormone intatto; confronto con le specifiche dichiarate nella metodica utilizzata e con il CV stato dell'arte della VEQ a cui il Laboratorio partecipa.

Materiali e Metodi. Sieri per controllo di qualità interno DicoCARE (CARE S.r.l) Genova, MET1 e MET2, a due livelli di concentrazione per ogni seduta analitica, con analisi di un periodo di sei mesi. Gli analiti indicati sono dosati con metodo chemiluminescente (CLIA) e con uno strumento IMMULITE 2000-MEDICAL SYSTEMS (Genova).

I dati di CV stato dell'arte (=precisione media dei metodi) sono ricavati dalla VEQ DicoCARE TM- 2005.

Risultati. vedi allegato.

Conclusioni. I CV analitici intraserie ottenuti sono rispondenti alle specifiche dichiarate dalle metodiche utilizzate e nettamente inferiori al CV stato dell'arte della VEQ indicata. Attualmente per gli analiti esaminati non esistono ancora in letteratura standard internazionali di riferimento e specifiche di qualità basate su criteri da preferirsi rispetto allo stato dell'arte. E' importante comunque garantire, tramite un adeguato programma di controllo di qualità interno e la partecipazione a programmi di VEQ, la qualità analitica dei propri risultati.

Bibliografia. Callum G. Fraser: La variabilità biologica dai principi alla pratica- Biomedica Source Books-Milano Ed. 2004.

ACTH	Media (pg/ml)	DS	CV analitico Intra serie	CV Stato arte
MET1	62.5	5.9	9.4%	24%
MET2	519.2	42.7	8.2%	24%
C-Peptide	Media (ng/ml)	DS	CV analitico Intra serie	CV Stato arte
MET1	1.22	0.16	13.1%	28%
MET2	5.43	0.33	6.1%	28%
PTH	Media (pg/ml)	DS	CV analitico Intra serie	CV Stato arte
MET1	688.1	43.1	6.3%	25%
MET2	68.4	4.8	7.0%	25%

076

IL "CRUSCOTTO DIREZIONALE": UNO STRUMENTO INFORMATICO PER L'ANALISI E LA GESTIONE DEI FLUSSI DI LAVORO

M. S. Graziani¹, P. Rizzotti¹, A. Rossini¹

¹Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche Ospedale Civile Maggiore Azienda Ospedaliera di Verona

Introduzione. Il governo di strutture complesse richiede strumenti adeguati in modo che le decisioni siano basate su dati oggettivi e su una precisa analisi della situazione esistente. Scopo del presente lavoro è quello di presentare l'utilizzo di uno strumento informatico che consente di avere in modo dinamico informazioni accurate sui flussi operativi all'interno del Laboratorio.

Metodi. Il cruscotto direzionale è un software che permette l'analisi in tempo reale del processo produttivo, elaborato dal fornitore del sistema gestionale del Laboratorio (Noemalife, Bologna).

Risultati. Riportiamo un esempio delle informazioni ottenibili. Nel marzo 2006 il primo ordine di stampa ai reparti di esami in routine era dato alle ore 14 mentre da più parti veniva ribadita l'esigenza di disporre dei referti prima di quell'ora. L'analisi fornita dal cruscotto direzionale indicava che alle ore 13, in media l'80% degli esami dei degenti era già validato e quindi pronto per essere stampato e un altro 10% era in attesa di validazione. Sulla base di tali dati abbiamo anticipato la stampa di 60 minuti. L'analisi del mese di aprile ha evidenziato che alle ore 13, gli esami da stampare si erano ridotti al 5%, mentre permaneva un 10% in attesa di validazione. L'ulteriore azione quindi va indirizzata verso il miglioramento dei tempi di validazione.

Discussione. Creare e mantenere all'interno del Laboratorio una organizzazione efficiente ed efficace richiede di compiere scelte che siano in linea con le esigenze cliniche. Questo è un esempio semplice di come una decisione che ha portato un vantaggio clinico abbia potuto essere presa sulla base di dati oggettivi, facilmente consultabili e di come sia poi possibile con lo stesso strumento, verificare gli effetti della decisione presa. Strumenti di questo tipo, in grado di analizzare in modo dinamico molti dati diversi, consentono di organizzare al meglio il processo produttivo secondo il ciclo del miglioramento continuo: pianificare, attuare, verificare, agire.

Bibliografia. Burnett D, Plebani M Guida pratica all'accreditamento dei laboratori clinici. Biomedica Milano 2003

077

SYSTEMATIC DIFFERENCES BETWEEN COMMERCIAL IMMUNOASSAYS FOR THYROGLOBULIN AND ANTI-Tg AND ANTI-TPO AUTOANTIBODIES IN AN EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEMEA. Iervasi¹, A. Mercuri¹, S. Masini¹, A. Pilo¹, G. C. Zucchelli¹¹CNR, Institute of Clinical Physiology, Pisa

The measurement of serum thyroglobulin (Tg) is widely adopted in the follow-up of patients affected by differentiated thyroid cancer and is routinely carried out in many laboratories. Due to heterogeneity of circulating Tg, different specificity of antibodies and differences in calibrators, wide differences still remain between results produced in different laboratories. To better investigate the discrepancies between methods and to evaluate the analytical performance of the laboratories, our Institute organized in 2004 an External Quality Assessment (EQA) scheme for Tg which involved about 50 Italian laboratories. Statistics of collected results were prepared and circulated sending back to the laboratories periodic reports. The Tg-check program continued also in 2005 and, since the measurement of auto-antibodies anti Tg is crucial for Tg evaluation, in 2006 EQA cycle we decided to add also the measurement of antibodies anti-Tg (AbTg) and anti-TPO (AbTPO). At present time about 90 laboratories are involved in the scheme. The collected results are analyzed and the performance of the participating laboratories and of the different methods evaluated. Total variability (between-labs, between-methods) was about 30 CV% for control samples at Tg concentration <1 µg/L, 20 CV% for control samples at Tg concentration <5 and >1 µg/L and 10 CV% for control samples at Tg concentration >5 µg/L. In a control samples prepared from sera of AbTg positive patients total variability of Tg was about 70 CV%. Even if, the introduction of CRM 457 calibrator has reduced the differences between methods, Tg values measured with different assays remain quite difficult. As for auto-antibodies assays, total variability of results was 46-73 CV% for AbTg and 44-66 CV% for AbTPO. This large variability between methods is probably due to: 1) differences in defining the positive cut-off concentration (cut-off suggested by manufacturers are: from 30 to 115 IU/mL for AbTg and from 12 to 60 IU/mL for AbTPO); 2) absence of adequate international reference preparation; 3) differences in preparation of autoantigen used in the assays; 4) poor analytical precision of the assays.

078

IL TECNICO SANITARIO DI LABORATORIO NELLA GESTIONE DEL DATO ANALITICOA. Villani¹, M. Michelotti², N. Carrara³, F. Como⁴, S. Lazzarini⁵, S. Ribero³¹ASL10, Pinerolo, Torino²Osp. Mauriziano, Torino³Osp. S.Croce e Carle, Cuneo⁴ASL 22, Novi Ligure, Alessandria⁵Nuovo Osp. San Giovanni di Dio, Firenze

Obiettivo. Esaminare il processo dal punto di vista del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico (TSLB), dal controllo del campione fino alla gestione dei dati analitici, attraverso il rispetto delle procedure definite per i singoli processi; individuarne i passaggi critici. Creare una cultura condivisa, riconoscere le responsabilità interne, identificare nella maniera più efficace le varie tipologie di errori. Favorire la segnalazione di eventi avversi ed inattesi.

Materiali e Metodi. Ogni professionista, proveniente da strutture certificate e/o accreditate, ha raccolto i dati nei diversi settori analitici per un anno, analizzando i punti più vulnerabili del processo; ha valutato la ricaduta dei possibili errori ed evidenziato le aree di criticità intervenendo per ridurre il numero degli errori, garantendo un dato più sicuro.

Risultati. La tabella mostra il totale degli errori (in parti per milione-ppm) per il numero di utenti (fasi pre e post analitica) e per il numero di test (fase analitica).

Conclusioni. La normativa ISO (9001:2000 e 15189) segue continuamente i prodotti che entrano nel ciclo produttivo. La registrazione degli inconvenienti e della loro risoluzione, permette di effettuare adeguate azioni correttive e garantire una buona qualità del prodotto erogato.

Il "risultato" è l'espressione diretta dell'attività del TSLB, valutato alla luce dei controlli indispensabili per garantirne l'esattezza e la qualità. Tali atti si espletano dalla fase pre-analitica alla fase analitica fino alla validazione dei valori ottenuti, attraverso una corretta e responsabile valutazione critica del dato analitico.

SETTORI	Pre-A	A	Post-A
Chimica Clinica	600	0.1	1
Ematologia Coagulazione	160	1	1
Immunometria	1000	500	500
Biologia Molecolare	30	1	1
Microbiologia	5911	313	154
Validazione Finale	5033	-	177

079

DALLA MISURA DEL CLIMA INTERNO DEL LABORATORIO AL MIGLIORAMENTO CONTINUO DEL SUO SISTEMA DI GESTIONE

R. Marozzi¹, G. Carusillo¹

¹A.O. Chiari - Laboratorio Analisi P.O. di Iseo (BS)

Un'organizzazione basa il suo prestigio ed il successo sulle persone e sui mezzi che la costituiscono. La Direzione deve gestire le risorse umane come un elemento strategico.

L'interrelazione, le responsabilità e le autorità tra le persone sono situazioni in evoluzione e formano l'elemento con cui gli individui definiscono il giudizio sulla qualità dello stare insieme: il clima interno.

L'industria da anni applica la possibilità di "misurare" il clima interno mediante questionari ed anche per i laboratori dei gruppi di lavoro hanno recentemente proposto strumenti personalizzati.

Avendo deciso di aderire ad un gruppo di lavoro, nel gennaio 2005 al personale non dirigente del laboratorio è stato distribuito il questionario composto da 54 domande, con risposta a 5 gradi (due negativi, un intermedio e due positivi), divise in 5 aree tematiche: credibilità, rispetto, equità, orgoglio, cameratismo.

I risultati, elaborati secondo la metodologia indicata dal gruppo di lavoro (somma di due gradi positivi), ha dato una matrice dei risultati.

Il risultato complessivo di 41,4/100 dispone il laboratorio in buona posizione rispetto a quella di gruppo (30/100).

Tra i risultati nell'area tematica dell'equità sono però stati isolati degli elementi di sofferenza; da qui l'avvio di un programma di lavoro basato su un Gruppo di Miglioramento composto da personale del servizio.

Sono state definite le tappe e mediante le proposte del gruppo è stata eseguita una revisione generale del protocollo interno di gestione e formazione del personale. Sono state individuate nuove modalità di comunicazione interna, rielaborati i processi di lavoro con la definizione di 22 percorsi di qualificazione degli operatori, strutturata la modalità di registrazione e rivalutazione della qualificazione, emessa l'opportuna modulistica per la gestione.

I risultati ottenuti sono stati: maggiore coinvolgimento e la responsabilizzazione del personale, riduzione significativa delle non conformità analitiche imputabili all'operatore.

Il lavoro svolto nel percorso di miglioramento ha consentito di rispondere anche al progetto Joint Commission della Regione Lombardia sulla qualificazione del personale.

- Atti III Convegno Nazionale Club della Qualità 2005.

080

VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ PERCEPITA DALL'UTENTE AMBULATORIALE: STIMOLO PER IL MIGLIORAMENTO DEL SERVIZIO

L. Sciacovelli¹, S. Altinier², C. Pozzato², A. Romice², S. Gelsumini², A. D'Osualdo², M. Plebani²

¹Centro Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

²Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università, Padova

Le indagini di soddisfazione dell'utente rappresentano un utile strumento per verificare i risultati conseguiti in relazione alle attese e per far emergere i punti critici e di eccellenza del sistema.

Scopo di questo lavoro è presentare i risultati ottenuti relativamente all'utente ambulatoriale. A tal fine è stato preparato un questionario (consegnato all'utente con una breve presentazione per esplicitarne lo scopo) la cui formulazione ha tenuto conto di alcuni aspetti fondamentali: assoluto anonimato; semplicità di linguaggio; domande dirette e precise a risposta chiusa; somministrazione in auto-compilazione. L'indagine mirava a focalizzare gli aspetti relativi a struttura, prestazioni, personale ed esigenze di miglioramento.

Sono state raccolte 737 risposte in 23 giorni. I risultati dimostrano che la percezione dell'efficacia del Servizio risulta medio-alta (abbastanza efficace: 42.5%; efficace: 41%; molto efficace 9%) mentre la maggiore criticità è la carenza di spazi in relazione all'affluenza e, di conseguenza, i tempi di attesa (dati in Tabella).

Sono emersi, inoltre, alcuni aspetti di eccellenza: competenza professionale (42%) e relazionali (40%).

L'analisi dei risultati ha stimolato la formalizzazione di un progetto per la redistribuzione degli spazi al fine di accogliere il continuo aumento dell'affluenza e migliorare la soddisfazione dell'utente ambulatoriale.

È compito del personale del servizio individuare gli interventi più appropriati per migliorare le attività gestionali organizzative e far emergere la competenza tecnico-professionale del servizio come elemento discriminatore per la scelta da parte dell'Utente.

Attesa (minuti)	Tempo di attesa per:		
	accettazione	prelievo	ritiro referti
<15	18,5 %	33,4 %	33,7 %
15-30	33,1 %	43,4 %	41,9 %
30-45	30,0 %	16,6 %	16,8 %
45-60	12,7 %	4,2 %	3,3 %
>60	5,8 %	2,3 %	4,3 %

081

VEQ PER L'IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI DEL SEDIMENTO URINARIO: 5 ANNI DI ESPERIENZAS. Secchiero¹, G. B. Fogazzi², C. Artusi¹, L. Sciacovelli¹, L. Zardo¹, M. Plebani¹¹Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)²U.O. di Nefrologia, Fondazione IRCCS, Policlinico, Milano

Il Programma di VEQ "Urinalysis Performance", è nato nel 2000 con il patrocinio di AIPaC, SIBioC, SIMeL e SIN per fornire uno strumento di educazione continua sull'esame chimico-fisico e microscopico dell'urina, indirizzato a tutti coloro che effettuano tale esame a scopo diagnostico.

Vi partecipano 412 laboratori (20 stranieri) e prevede l'invio di 8 foto, in campo chiaro ed in contrasto di fase, distribuite in 4 esercizi, per l'identificazione degli elementi del sedimento e di 6 campioni liofili (3 esercizi) per l'analisi chimico-fisica.

In questo lavoro ci limiteremo a descrivere la parte relativa al sedimento urinario.

Il Programma da quest'anno prevede l'inserimento delle risposte, relative sia all'identificazione degli elementi che all'associazione clinica (a scelta tra cinque opzioni), sul sito web. Ad ogni esercizio viene pubblicato un rapporto personalizzato con la valutazione delle risposte, effettuata da uno Specialista Nefrologo, ed un rapporto generale contenente i risultati complessivi ed un commento degli stessi con spunti di studio e riferimenti bibliografici.

Nei primi 5 anni di VEQ sono state inviate 64 immagini (128 foto): 15 immagini di cellule, 7 di lipidi, 16 di cilindri, 2 di cilindroidi, 15 di cristalli, 4 di micro-organismi e 5 di contaminanti. Sono stati presentati 49 elementi del sedimento, 15 dei quali ripetuti (Tabella).

A parte qualche eccezione (es. Eritrociti isomorfi, presentati con forme diverse), si è osservato un buon miglioramento nell'identificazione degli elementi(+). Questo conferma che il Programma di VEQ è un utile percorso formativo di verifica ed un valido strumento per il miglioramento continuo dell'esame del sedimento.

Elementi	Risp. corrette %	I	II	%
Eritrociti isomorfi	91.7	64.5	-27.7	
Cristalli di acido urico	99.2	82.3	-16.9	
Cellule transizionali superfic.	86.8	80.9	-5.9	
Cilindro cereo	89.8	85.2	-4.6	
Crist. di Ca-ossalato bi-idrato	100.0	100.0	0.0	
Leucociti polimorfonucleati	98.3	98.4	+0.1	
Cristalli di Triplofosfato	99.6	99.4	+0.2	
Crist. di Ca-ossala mono-idrato	93.0	96.6	+3.6	
Cilindro finemente granuloso	65.8	82.4	+16.6	
Cellule tubulari renali	52.9	69.6	+16.7	
Corpo ovale grasso	58.3	83.2	+24.9	
Cellule transizionali profonde	56.7	89.1	+32.4	
Macrofaço	10.9	44.4	+33.5	
Cristalli di colesterolo	55.5	99.7	+44.2	
Cilindro leucocitario	9.2	86.4	+77.2	

082

UN ESPERIMENTO DI CENTRIFUGAZIONE DEI CAMPIONI NEL PUNTO PRELIEVI PERIFERICO PER IL CONTROLLO DELLA FASE PREANALITICAV. Zanardi¹, M. Bianchin², G. Ravaglia³¹Resp. Sez. di Lugo, Lab. Ravenna, Dir. V.Ceroni²Direttore Distretto di Lugo AUSL Ravenna³Coordinatore Servizio infermieristico ambulatoriale Distretto di Lugo AUS Ravenna

Il tempo che intercorre fra il momento del prelievo e quello del trattamento del campione è una variabile di difficilissimo controllo nell'ambito dell'assicurazione di qualità delle analisi effettuate. Anche se basta una cattiva organizzazione del reparto clinico (prelievi eseguiti "all'alba" dall'infermiere che smonta dal turno di notte), il problema è sicuramente acuito dall'aumentare delle dimensioni dei laboratori e dal numero di "clienti" che si rivolgono ad essi. Alla Sezione di Lugo del Laboratorio di Ravenna fanno capo 26 punti prelievo periferici con tempi di arrivo dei campioni che vanno da 1.5 a 3.5 ore dal momento di inizio dei prelievi stessi. Questo intervallo, al di fuori degli standard NCCLS (che prevedono un tempo massimo di due ore dal momento del prelievo al momento della centrifugazione del campione di chimica), provoca un bias significativo soprattutto sul glucosio ed il potassio.(1) Nell'ambito della progettazione del laboratorio di Area Vasta Romagna (dove i tempi di percorrenza potranno essere ancora più lunghi) e sulla scorta di esperienze di altri laboratori, (Laboratory Medicine Center Malmo University Hospital Dir. Dott. Per Simonsson) è stata avviata la sperimentazione di centrifugazione dei campioni in un punto prelievi. Dal mese di aprile 2006, le infermiere che eseguono i prelievi nel comune di Alfonsine (RA), sono state dotate di una centrifuga ed istruite ad eseguire una semplice procedura di centrifugazione. Il personale ha accettato facilmente questo compito che, del resto richiede pochissimo tempo. Le verifiche fatte sul dosaggio della glicemia (tramite confronto fra siero e plasma stabilizzato con fluoruro) sui campioni prelevati nei primi 15 minuti di attività, vedevano un bias del 7% prima dell'introduzione dell centrifugazione mentre dopo non presentano più variazioni significative. Bibliografia. Clinical Chemistry 48:12 2242-2247 (2002)

083

EFFECT OF PHYSIOLOGICAL CONCENTRATION OF CAFFEIC ACID ON NORMAL AND DIABETIC HUMAN ERYTHROCYTES UNDER OXIDATIVE STRESS

G. Goi¹, C. J. Baquero Herrera¹, L. Massaccesi¹

¹Dip. di Chimica, Biochimica e Biotecnologie per la Medicina, Università degli Studi di Milano

Introduction. Type 2 diabetes is the most prevalent and serious metabolic disease affecting people all over the world. Recent studies hypothesize that oxidative stress present in type 2 diabetes subjects suppresses insulin biosynthesis and is involved in progression of insulin resistance (1), therefore, an evaluation of the potential usefulness of dietary antioxidants in treatment for type 2 diabetes is required. Several in vitro studies on human erythrocytes (RBCs) show the antioxidant property of some polyphenols but the used concentrations are very high and far to in vivo reachable concentrations.

Objectives. We undertaken a study on the potential antioxidant effect of caffeic acid, a phenolic acid with hydroxycinnamic structure, at in vivo-like concentration (1µM) (2), on erythrocytes membrane fluidity and on some membrane and cytosolic glycohydrolases activities that, recently, have been proposed as a very sensitive tool for evaluating erythrocytes oxidative stress (3).

Materials and Methods. Blood samples from health subjects and diabetics type 2 patients were collected. RBCs, preincubated with 1µM of caffeic acid, have been stressed by a Xanthine/Xanthine oxidase (X/XO) system for 1 hour. At the end of incubation we analyse: a) membrane fluorescence anisotropy; b) cytosolic O-GlcNAcase and Hexosaminidase activities; c) β-D-glucuronidase (GCR) and Hexosaminidase activities in plasma membrane.

Results. In our experimental conditions we confirm the decrease of membrane fluidity and an increment of membrane GCR activity in diabetics subjects. We do not found any appreciable effect of caffeic acid on enzyme activities nor in membrane fluidity.

Conclusions. Although caffeic acid has been reported to protect against oxidative stress in in-vitro experiments (4), our results clearly indicated that this effect do not occur at in vivo concentration. Possible synergistic in vitro effects with other polyphenols and/or their derivative metabolites at physiological levels will be focused in further studies.

Reference. Kaneto H., et al. (2005) *IJBCB* 37, 1595-1608. Nardini M., et al. (2006) *J Nutr Biochem* 17, 14-22. Goi G., et al. (2005) *Exp Ger* 40, 219-225. Hsieh C.L., et al. (2005) *J Agric Food Chem* 53, 6151-6155.

084

INDAGINE CONOSCITIVA SULLA MISURA DELLA ALBUMINA NELLE URINE NEI LABORATORI ITALIANI A CURA DEL GRUPPO INTERSOCIETARIO DIABETE MELLITO

M. S. Graziani¹, A. L. Caldini², F. Ghiara³, M. Gambassi², C. Lo Cascio¹, R. Testa⁴, A. Mosca⁵

¹Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche

Ospedale Civile Maggiore Azienda Ospedaliera di Verona

²Laboratorio Generale DAI Diagnostica di Laboratorio Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi Firenze

³Laboratorio Analisi AUSL 3 Genova

⁴Unità Operativa di Diabetologia Dipartimento Ricerche INRCA-IRCCS Ancona

⁵Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche Università degli Studi di Milano

Introduzione. La misura della albumina urinaria è un parametro cardine nel monitoraggio del paziente diabetico (1). A fronte della sua importanza clinica, la standardizzazione della misura è carente. Per approfondire il problema, il gruppo di studio intersocietario Diabete Mellito ha avviato una indagine conoscitiva. Il presente lavoro presenta le risposte pervenute ed elaborate

Metodi. Un questionario di 21 domande è stato diffuso attraverso le due Società e le organizzazioni di Verifica Esterna di Qualità. Le risposte sono state raccolte in un database. Le domande riguardano gli aspetti preanalitici (campione), analitici (metodo, controllo di qualità) e post analitici (unità di misura, valori di riferimento)

Risultati. Sono pervenuti 153 questionari. I dati salienti sono così riassunti. Il tipo di campione maggiormente impiegato è la Raccolta 24 ore (56%), seguito dal Campione Estemporaneo (16%), 2° minzione (14%) e Temporizzato (8%). Più della metà dei laboratori (55%) utilizza il metodo Turbidimetrico, il 39% il Nefelometrico. L'85% dei laboratori esegue il Controllo Interno di Qualità, mentre solo il 28% partecipa a Verifiche Esterne di Qualità. Esiste grande difformità nelle unità di misura. Il 37% utilizza la Concentrazione nelle 24 ore, il 32% la Concentrazione per Volume, il 22% il Rapporto con la Creatinina, l'11% l'Escrezione per Minuto. All'interno di queste categorie la variabilità è notevole: si utilizzano ug, mg, dL, L, mol etc. I valori di riferimento sono in accordo con le raccomandazioni dell'American Diabetes Society solo nel 36% dei Laboratori

Discussione. Dall'esame delle risposte ricevute è evidente che i comportamenti nella misura della albumina urinaria sono in linea con le raccomandazioni vigenti solo in minima parte, pur essendo queste stabilite e consolidate da qualche anno. Il non adeguamento alle raccomandazioni include: l'utilizzo prevalente della raccolta delle 24 ore, la difformità delle unità di misura impiegate, e soprattutto i valori di riferimento. E' necessaria quindi una importante opera di informazione/educazione perché solo l'omogeneizzazione dei risultati forniti consentirà comportamenti clinici adeguati nella gestione del paziente diabetico

Bibliografia. *Diabetes Care* 2006;29:Suppl 1

085

UTILIZZO DEL GLUCOMETRO PER LA MISURAZIONE PRELIMINARE DELLA GLICEMIA BASALE IN PAZIENTI DA SOTTOPORRE A CURVA DA CARICO DI GLUCOSIO

C. Lo Cascio¹, N. Zanella¹, E. Benedetti¹, C. Cocco¹, P. Rizzotti¹

¹Lab. di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, OCM, Az. Osp. Verona

Scopo del lavoro. Valutare l'utilizzo del glucometro per la misura della glicemia basale in pazienti da sottoporre a curva da carico orale di glucosio, misurazione effettuata al fine di decidere se la somministrazione del glucosio sia appropriata.

Metodi. Nei soggetti che vengono sottoposti a curva da carico di glucosio, contemporaneamente all'effettuazione del prelievo per la misurazione della glicemia basale, viene misurata la glicemia mediante glucometro. A tale scopo si utilizza una goccia di sangue intero ricavata dalla siringa con cui, in questo caso, si effettua il prelievo. Il risultato viene registrato nel modulo anamnestico che accompagna tale analisi. Qualora il risultato sia \geq a 7.0 mmol/L si esegue il dosaggio in laboratorio della glicemia basale e la somministrazione del glucosio avviene sulla base di questo risultato. Il glucometro in uso (ACCU-CHECK Sensor ROCHE) è basato sulla reazione della glucosio deidrogenasi misurata mediante sensore elettrochimico; la glicemia basale viene misurata in laboratorio su plasma con anticoagulante litio eparina e inibitore della glicolisi sodio fluoruro, mediante analizzatore Dimension RxL MAX (Dade Behring) con metodo dedicato (un adattamento del metodo esochinasi).

Risultati. Sono stati analizzati 181 dati, con valori di glicemia nel range 3.6-7.9 mmol/L.

La correlazione tra glucometro e glicemia misurata in laboratorio (mmol/L) è : $y=0.773x +1.22$ con un coefficiente di correlazione di 0.71. Il bias medio tra glucometro e Dimension RxL è risultato -1% il 5° percentile della distribuzione dei bias è -17% e il 95° 12%. Il 21% dei campioni ha una differenza assoluta maggiore del 10% rispetto al dato di laboratorio; il 5% una differenza maggiore al 20%. In 3 casi si è avuta una somministrazione non necessaria del carico di glucosio (il campione con glicemia basale più elevata è risultato 7.9 mmol/L).

Conclusioni. Per l'utilizzo nell'ambito di nostro interesse, il glucometro risulta appropriato, fornendo un risultato rapido che permette di rendere più brevi i tempi di esecuzione della curva da carico di glucosio, tenendo conto che il valore di glicemia refertato come basale è sempre quello fornito dallo strumento in laboratorio.

086

INVERSE CORRELATION BETWEEN SERUM Free IGF-1 and IGFBP-3 LEVELS AND BLOOD PRESSURE IN PATIENTS AFFECTED WITH TYPE 1 DIABETES.

A. Minucci¹, P. Lulli¹, D. Pitocco², E. Di Stasio¹, S. Rocchetti¹, A. Vento², B. Giardina¹, C. Zuppi¹, G. Ghirlanda², F. Ameglio¹, E. Capoluongo¹

¹Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry & Clinical Biochemistry; Catholic University, Rome, Italy
²Internal Medicine Institute, Catholic University, Rome, Italy

Background. Although in mouse model the gene coding for IGF-1 is considered one of the most important to regulate blood pressure, few discordant data are available in the literature regarding a possible relationship between blood pressure and serum free IGF-1 values in humans. No information is available on type 1 diabetes patients.

Aim. To analyze the relationship between systolic and diastolic blood pressure and serum free IGF-1 and IGFBP-3 levels subjects suffering from type 1 diabetes analyzed at first observation, without anti-hypertensive therapies.

Methods. This study includes 246 consecutive, unrelated Caucasian subjects, collected between July 2003 and December 2005, belonging to a medium social-economic status. The recruitment was carried out only by the Diabetes Care Unit of the Catholic University (where they successively received regular health care), presenting a diagnosis of T1DM according to the American Diabetes Association (ADA) guidelines.

Results. A highly significant inverse correlation has been observed between serum free IGF-1 levels and both systolic and diastolic blood pressure in subjects affected with type 1 diabetes. Similar but less significant relationships were observed for IGFBP-3, whose levels were also significantly and directly correlated with those of free IGF-1. This correlation was confirmed by analysis of the free IGF-1 and IGFBP-3 levels after age and gender correction, in subjects with normal or high systolic or diastolic blood pressure.

Conclusions. Free IGF-1 and IGFBP-3 levels (decrease) and blood pressure (increase) influenced significantly the presence of diabetic complications, confirming that these molecules may be considered as severity markers of patients with type 1 diabetes and also risk factors for diseases linked to altered pressure control.

087

ESPERIENZE CON UN METODO ENZIMATICO PER LA MISURA DELLA ALBUMINA GLICATA PLASMATICA

A. Mosca¹, F. Ceriotti⁵, R. Galanello³, G. B. Leoni³, A. Panico⁵, E. Scurati⁵, R. Paroni², R. Paleari¹, L. Scaldaferrì⁴, A. Lapolla⁴

¹Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano

²Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano

³Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Cagliari

⁴Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Padova

⁵Diagnostica e Ricerca S. Raffaele spa, Milano

Introduzione. La misura dell'albumina glicata plasmatica è di particolare utilità nel monitoraggio a breve-medio termine del compenso glicometabolico dei pazienti diabetici. Scopo del presente lavoro è la valutazione di un nuovo metodo enzimatico per la misura dell'albumina glicata, con applicazione ad una casistica selezionata, ed il confronto con altri test pertinenti (glicemia a digiuno e dopo carico, fruttosammina, emoglobina glicata).

Metodi. È stato effettuato uno studio multicentrico nel quale la raccolta dei campioni è stata effettuata in tre centri diversi (Milano, Padova e Cagliari) ed i campioni di siero, congelati a -80 °C, sono stati spediti in ghiaccio secco ed analizzati a Milano su Modular Roche P. I reattivi per l'albumina glicata plasmatica (Lucica GA-L enzymatic assay) erano della Asahi Kasei Pharma (Tokyo, Giappone), la fruttosammina era misurata con test Roche, e l'HbA_{1c} (misurata separatamente nei tre centri su campioni di sangue fresco in EDTA) con HPLC allineati al sistema DCCT. Sono stati studiati 50 pazienti con diabete di tipo 2, 20 soggetti con diabete gestazionale, 30 soggetti con talassemia major, 10 pazienti epatopatici, 10 nefropatici e 40 soggetti adulti sani di controllo.

Risultati. La riproducibilità entro-la-serie è risultata compresa tra 3.0 e 4.1% (in termini di CV, 4 diversi materiali a livelli normali e patologici), tra-le-serie compresa tra 2.8 e 3.0%. La linearità è stata provata per l'intervallo tra 13 e 36% ($r^2 = 0.9932$). Le correlazioni tra GA ed HbA_{1c} sono risultate le seguenti: a) diabetici tipo 2: $r = 0,518$ (buon controllo glicemico), $r = 0,759$ (cattivo controllo); b) nefropatici: $r = 0,273$; c) epatopatici: $r = 0,186$; d) talassemici trasfusi non diabetici: $r = 0,004$.

Conclusioni. L'esperienza fatta con il nuovo test enzimatico ne prova la buona riproducibilità e robustezza. Confermiamo che l'albumina glicata plasmatica è correlata meglio dell'HbA_{1c} alla glicemia a digiuno e che inoltre è più sensibile dell'HbA_{1c} a rapidi cambiamenti del controllo glicometabolico. Il test è inoltre particolarmente utile quando la misura dell'HbA_{1c} è di difficile interpretazione.

Bibliografia. Kouzuma T et al. Clin Chim Acta 2004;346:135-143.

088

ESPERIENZA CON UN METODO IN ELETTROFORESI CAPILLARE PER LA MISURA DELL'EMOGLOBINA GLICATA NEL SANGUE

R. Paleari¹, A. Mosca¹

¹Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano

Introduzione. Scopo del presente lavoro è stata la valutazione delle principali prestazioni analitiche di una metodica in elettroforesi capillare (CE) per la misura dell'emoglobina glicata nel sangue (CEofix HbA_{1c}, Analis, Belgio) che è stata applicata su uno strumento di recente introduzione, il ProteomeLab PA800 della Beckman Coulter. È stata inoltre valutata la commutabilità di alcuni materiali di controllo liofilici per verificare il loro possibile utilizzo per la calibrazione ed il controllo di qualità della metodica stessa.

Metodi. Le caratteristiche principali del metodo in CE sono le seguenti: capillare di 25 µm di diametro e 10 cm di lunghezza alla finestra, doppio rivestimento dinamico delle pareti del capillare, separazione a pH 4.6, tempo di analisi di 4.75 minuti. Sono stati analizzati in duplicato 45 campioni di sangue da soggetti normali e diabetici e 12 materiali di controllo utilizzati in programmi di VEQ nazionali o preparati in casa. Come metodica di confronto è stato utilizzato il sistema HPLC Tosoh G7 con calibrazione NGSP. La commutabilità dei materiali liofilici è stata valutata rispetto agli intervalli di predizione al 95% della retta di regressione dei confronti tra metodiche.

Risultati. La riproducibilità su sangue (CV %) è risultata uguale a 1.7% (HbA_{1c}=5.6%) e 1.3% (HbA_{1c}=9.8%). Sui controlli liofilici è stato ottenuto un CV di 1.5%. Tutti i controlli liofilici sono risultati commutabili e due di essi, con concentrazione di HbA_{1c} normale e patologica, sono stati utilizzati per la calibrazione a posteriori dei risultati ottenuti in CE. I risultati del confronto tra metodi hanno dimostrato un'ottima correlazione tra CE e HPLC ($r=0.9971$) come pure un buon grado di accordo tra le due metodiche ($y=0.9878x - 0.050$). L'analisi di Bland-Altman ha mostrato una differenza media (CE-HPLC) di -0.1% (CI tra -0.5 e 0.3%).

Conclusioni. La riproducibilità delle misure ottenute in CE è molto buona e soddisfa gli attuali traguardi (CV accettabile < 3.7%). Dopo calibrazione, il metodo risulta ben allineato con il sistema NGSP.

Bibliografia. Jenkins M, et al. Clin Chem Lab Med 2003;41:747-54.

089

VALUTAZIONE DI UN SISTEMA "SELF-TESTING" NEL DOSAGGIO DELLA GLICEMIA: ANALISI DELLA CONCORDANZA ANALITICA CON ANALIZZATORE DI CHIMICA SECCA

E. Devangelio¹, C. Romano², M. C. Zuccaro², A. Consoli¹, C. Di Cosmo², S. Martinotti²

¹Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento-Università G. d'Annunzio, Chieti

²Laboratorio Analisi Ospedale Clinizzato SS Annunziata, Chieti

Introduzione. La richiesta di informazioni da parte di varie utenze sulla concordanza dei sistemi "self-testing" con il laboratorio dell'Osp. "SS Annunziata di Chieti" per la misurazione della glicemia ci ha indotto a valutare un sistema di uso corrente con il nostro sistema Vitros di riferimento.

Scopo del lavoro. Per verificare quale fosse l'indice di concordanza tra i due sistemi abbiamo utilizzato gli stessi campioni biologici provenienti da pazienti ospedalizzati e ambulatoriali per la determinazione della glicemia a digiuno e dopo OGTT.

Materiali e Metodi. La glicemia è stata dosata su siero utilizzando il Vitros 950 (JeJ) e su sangue intero venoso con EDTA utilizzando l'Accu chek-Active (Roche). La glicemia è stata dosata in un gruppo campione di 163 casi di cui 118 a digiuno e 45 eseguite durante OGTT. Presupposto del lavoro è che i campioni biologici dello stesso soggetto, prelevati allo stesso tempo ma con obiettivi analitici diversi (glicemia su siero ed emocromocitometrico), non subissero variazioni significativi della glicemia nell'arco di tempo di 2-3 ore.

Risultati. I campioni a digiuno hanno i valori di glicemia dosati col glucometro più bassi rispetto a quelli dosati col Vitros. I dati su soggetti sottoposti a carico OGTT, dove il dosaggio della glicemia è stato effettuato sullo stesso campione primario (sangue intero EDTA), mostrano l'inversione di stima fra i due sistemi. Il test di Wilcoxon ($Z=-4.8$; $P=0.00$) evidenzia la non concordanza dei due sistemi.

Conclusioni. I dati preliminari relativi alla glicemia a digiuno ci avevano portato a constatare la sovrastima del sistema di riferimento (Vitros) rispetto al sistema self-testing (1). Tuttavia, l'analisi dei campioni sottoposti a OGTT ha mostrato valori al "self-testing" più alti rispetto al Vitros.

L'ipotesi da noi formulata potrebbe coinvolgere il diverso processo di glicolisi in vitro nei due campioni biologici utilizzati, pur avendo essi la stessa fase preanalitica.

Questi dati, ancora preliminari, ci hanno stimolato ad aumentare la numerosità campionaria in modo da poter comprendere e chiarire questo fenomeno, anche alla luce della rilevanza clinica che ciò può assumere.

090

STUDIO DELLA DISTRIBUZIONE DEL RDW CALCOLATO CON IL CONTAGLOBULI ABBOTT CD3700 IN UNA POPOLAZIONE NON SELEZIONATA

S. Baravelli¹, A. Vernocchi¹

¹U.O. Laboratorio Analisi Ospedale di Forlì

Scopo dello Studio. In attesa di definire se la Red Distribution Width (RDW) debba o meno rientrare fra i parametri del referto ematologico la nostra esperienza è volta a fornire un piccolo contributo in merito suggerendo come tale parametro possa considerarsi un parametro strumento specifico e come tale non inserito fra quelli presenti nel referto ematologico. Scopo del nostro lavoro è stato individuare un intervallo di riferimento strumento specifico valido per una popolazione non selezionata e di raffrontare tali limiti con quelli della letteratura.

Materiali e Metodi. Il contaglobuli ABBOTT CELL DYN 3700 produce un emocromo includente un valore di RDW "relativo" equivalente ad un coefficiente di variazione espresso in percentuale. Il valore del RDW viene derivato dall'istogramma eritrocitario utilizzando l'ampiezza della distribuzione eritrocitaria al 50% dell'altezza del picco. Abbiamo eseguito l'emocromo con CELL DYN 3700 in modalità chiusa su 491 campioni non selezionati di sangue periferico raccolto in EDTA (K3) ricoverati nel nostro ospedale e su altri 197 campioni appartenenti a soggetti non ricoverati presumibilmente sani.

Risultati. Abbiamo ottenuto un valore medio di RDW pari a 15,1% nel primo gruppo di pazienti e di 14,0% nel secondo con range di riferimento (2,5-97,5 percentile) rispettivamente di 11,9%-21,2% e di 11,3%-17,7%.

Conclusioni. La media per il primo gruppo di pazienti è risultata essere superiore al limite massimo presente in letteratura (15,1% vs 14,5%) con un intervallo di riferimento più ampio. La media del secondo gruppo di campioni è risultata all'interno del range di riferimento tradizionale (14,0%) e l'intervallo di riferimento più ristretto. I risultati ottenuti dimostrano quindi come il CELL DYN 3700 su una popolazione non selezionata coglie il maggior grado di anisocitosi con valori di RDW superiori a quelli espressi sia da una popolazione sana (riferimento della letteratura) sia di una popolazione "presumibilmente sana" (soggetti non ricoverati afferenti al nostro centro prelievo) che a sua volta produce valori di RDW intermedi fra quelli della pop. di riferimento e quelli della pop. ricoverata

Bibliografia. P. Cappelletti et al per GdSE-SIMeL: Linee guida per il referto ematologico.

091

ANALISI DEL GENE HFE IN UN GRUPPO DI DONATORI SELEZIONATI PER IPERFERRITINEMIA

S. Bernabini¹, V. Cetica¹, F. Di Patti¹, S. Tanzi², A. Bertelli³, V. Maglio², F. Truschi³, F. Torricelli¹

¹SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze

²Sezione Trasfusionale, Figline Valdarno, ASL Firenze

³Servizio Trasfusionale, Zona Sud-Est, ASL Firenze

L'emocromatosi ereditaria (HH) è un disordine autosomico recessivo del metabolismo del ferro caratterizzato da un progressivo accumulo di ferro a livello tissutale. La forma di HH più comune è il tipo I, causata da mutazioni nel gene HFE (6p21.3); la più comune tra queste è la C282Y, riscontrata in omozigosi in circa il 64% dei pazienti italiani. Mutazioni minori (H63D, S65C) sembrano essere implicate in un moderato accumulo di ferro.

Lo scopo del lavoro è stato quello di caratterizzare per le 3 mutazioni di interesse un gruppo di 45 donatori di sangue del Valdarno Fiorentino, selezionati per un'alta ferritina sierica (FS > 300 ng/ml). Il risultato di tale indagine può essere il punto di partenza per la realizzazione di linee guida per valutare l'idoneità alla donazione da parte di soggetti con iperferritinemia causata da mutazioni nel gene HFE.

La caratterizzazione genetica dei soggetti in studio ha previsto l'impiego della Tecnologia Nanogen. Si tratta di una tecnologia high throughput poiché accurata, sensibile, rapida ed in parte automatizzabile, quindi adatta a realizzare studi su larga scala.

In 10 soggetti l'analisi genetica ha permesso di confermare il sospetto clinico di HH (7 H63D +/+, 1 C282Y +/+, 2 H63D +/- C282Y +/-); 12 soggetti sono risultati portatori di una mutazione (10 C282Y +/-, 2 H63D +/-), mentre 23 hanno mostrato un genotipo wild-type per le 3 mutazioni d'interesse. Le frequenze genotipiche ed alleliche osservate risultano statisticamente significative quando confrontate con quelle di donatori italiani non selezionati.

I dati ottenuti ci hanno portato a proporre un percorso per i donatori di sangue che mostrano iperferritinemia, allo scopo di valutare la possibilità per questi soggetti di non interrompere la donazione. Tale percorso prevede l'analisi genetica per confermare il sospetto clinico di HH, e successivamente test di funzionalità epatica, pancreatica e cardiaca. I soggetti positivi all'analisi genetica ma che non presentano danni funzionali d'organo risultano idonei alla donazione; la sospensione della donazione è invece prevista per coloro che mostrano test di funzionalità positivi.

Bibliografia. "Hereditary Hemochromatosis A New Look at an Old Disease" Pietrangelo N Engl J Med 2004

092

VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA TRA I CONTAGLOBULI SISMEX-XE 2100 E ADVIA 120

F. M. Biella¹, B. Cremonesi¹, C. Pozzobon¹, G. Limonta¹, P. Tramacere¹, P. Mocarrelli¹

¹Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Osp. di Desio, Desio (MI)

Introduzione. L'esame emocromocitometrico automatizzato rappresenta un valido supporto nella diagnostica ematologica di laboratorio. In occasione della sostituzione dello strumento ADVIA 120 (Bayer) con lo strumento XE-2100 (Dasit) presso il nostro laboratorio sono stati confrontati i risultati forniti dai due analizzatori con l'obiettivo di studiarne la concordanza.

Materiali e Metodi. Nel periodo di disponibilità dei due strumenti (20-30 marzo 2006) sono stati prelevati casualmente 116 campioni (circa 12 campioni al giorno per 10 giorni) dei quali è stata eseguita l'analisi con entrambi gli analizzatori. Tutti i campioni sono stati processati durante la routine e quindi sotto il controllo di qualità in uso. Sono stati confrontati i seguenti parametri: conteggio degli elementi corpuscolati (RBC, WBC, PLT), HGB, HCT, indici eritrocitari (MCV, MCH, MCHC) e formula leucocitaria a 5 popolazioni. La concordanza delle misure dei due strumenti è stata studiata secondo il metodo di Altman e Bland.

Risultati. La media delle differenze (XE - ADVIA) ha evidenziato una concordanza ottima per le variabili RBC (-0.016), HCT (-0.023), MCV (0.362) ed accettabile per HGB (-0.271).

È stato riscontrato un evidente bias per il conteggio PLT (-18.008) e WBC (-0.266). Nella conta differenziale dei WBC la media delle differenze ha evidenziato buona concordanza per le variabili linfociti (-0.105) e granulociti eosinofili (-0.04) mentre ha rilevato un evidente bias nella conta di monociti (3.951) e granulociti neutrofilici (-3.943). Modesto il bias riscontrato per i granulociti basofili (-0.25). Conclusioni. Per 5 delle 13 variabili studiate è stato riscontrato un mancato allineamento. Il bias relativo al conteggio PLT è dovuto al differente metodo di analisi (impedenziometrico per XE, ottico per ADVIA)¹. Il bias relativo alla conta differenziale dei leucociti è dovuto al diverso principio di separazione degli stessi utilizzato da XE e che sembra dalla letteratura essere più accurato².

Bibliografia. L. Sandhaus et al. 'Platelet counting by sysmex XE 2100 and advia 120: a comparative analysis' Am J Clin Pathol 2002 Aug 118:235-41. R. Herklotz et al. 'Precision and accuracy of leucocyte differential on Sysmex XE-2100' Sysmex J Inter 2001;11:1

093

HAEMATOLOGICAL RARE DISEASES: THE CASE OF HEREDITARY SPHEROCYTOSIS

P. Caprari¹, A. Tarzia¹, M. P. Caforio¹, A. M. Salvati¹

¹Rep. Biochimica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Hereditary spherocytosis (HS) is a rare disease belonging to the hereditary anaemia group (RDG010) according to Ministerial Decree 279/2001. It is the commonest cause of inherited chronic haemolysis in Northern Europe and North America with a quoted incidence of 1 in 5000 births. Clinical and laboratory presentation of HS is highly heterogeneous, ranging from an asymptomatic condition to a severe life-threatening anaemia with transfusion dependence. The common features of HS include mild anaemia, jaundice and splenomegaly. Neonatal jaundice is common and may be severe enough to require exchange transfusion. The abnormal red cell morphology is due to membrane protein defects mainly spectrin, ankyrin, band 3 and/or protein 4.2. Severe haemolytic anaemia is often associated with a greater reduction of the affected membrane proteins.

From 1996 to 2006 in our laboratory about 420 patients have been analysed for diagnosis of HS. The laboratory diagnosis was based on a combination of clinical history, family history, physical examination (splenomegaly, jaundice) and laboratory data (red cell indices and morphology, reticulocyte count, osmotic fragility test, erythrocyte membrane protein analysis by SDS-PAGE). All cases have been registered in a dedicated computerized clinical and laboratory data base.

Morphology, osmotic fragility test and reticulocyte count are the key diagnostic features of HS, but mild forms of the disease can be missed. The deficiency in a membrane protein associated with erythrocyte cytoskeleton confirmed the diagnosis of HS. Single or combined protein deficiencies have been found. The diagnosis in neonates may be more difficult, and a family study can be helpful. Co-inheritance of other haematological disorders, such as beta thalassemia or hereditary enzyme deficiencies can lead to variable clinical pictures. In such cases the erythrocyte membrane protein analysis allows to show the membrane protein defects, to perform diagnosis of HS and to predict clinical outcome.

094

IRON DEFICIENCY IN YOUNG HEALTHY WOMEN ACCORDING TO ORAL CONTRACEPTIVE USE

G. Casabellata¹, M. Di Santolo¹, G. Banfi², G. Stel³, F. Gonano³, S. Cauci¹

¹Department of Biomedical Sciences and Technologies, School of Medicine, University of Udine, Udine, Italy

²Sanitar Direction, Orthopedic Galeazzi Institute, School of Sport Sciences, and School of Medicine, Milan, Italy

³Department of Experimental and Clinical Pathology and Medicine, School of Medicine, University of Udine, Udine, Italy

Background. Iron-deficient fertile women risk underdiagnosis. There are no data about the effects of third generation oral contraceptives (OC) on levels of iron deficiency (ID) markers. Our aims were to evaluate the impact of OC on iron status in young fertile women and to identify the optimal parameters for diagnosing ID in OC users and non-OC users.

Methods. Conventional parameters of iron status (serum iron, transferrin, transferrin saturation, ferritin) were compared with the more recent parameter soluble transferrin receptor (sTfR). A total of 203 menstruating Caucasian women (aged 24±4.7 years) were recruited. ID was defined by serum ferritin <20 ng/mL combined with sTfR >1.70 mg/L. Anemia was defined by Hb <12 g/dL.

Results. Frequency of OC use among young Italian women was 29% (59/203). ID was detected in 18.2% (37/203) of enrolled women, and in 14.0% (24/171) of non-anemic women. OC use did not significantly affect either total ID or non-anemic ID prevalence. On the contrary, OC use markedly increased serum transferrin concentrations in OC users. Among non-anemic women, OC users had odds ratio (OR) 13.5 (CI 2.8-95, P <0.001) for transferrin over 360 mg/dL. No other iron status parameter was affected by OC. Of the single markers for ID, sTfR was the most effective, irrespective of OC use; sTfR >1.76 mg/L showed 95.8% sensitivity, 93.9% specificity.

Conclusions. New generations of OC pills do not affect ID, although they markedly increase serum transferrin concentrations. We highlighted that sTfR is not affected by OC; this finding was not previously described.

095

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA ZAP-70 IN PAZIENTI AFFETTI DA LLC;LINFOCITI SEPARATI O SANGUE INTERO?

C. Colombo¹, P. Tramacere¹, P. Mocarelli¹

¹*Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Desio (MI)*

Introduzione. L'analisi dell'espressione della proteina ZAP-70 in pazienti affetti da LLC può essere effettuata con diverse metodologie analitiche: i microarray, l'immunoistochimica o la citometria a flusso. I microarray non sono facilmente utilizzabili dai laboratori a causa dell'elevato costo mentre con l'immunoistochimica il valore di ZAP-70 viene sovrastimato a causa della presenza dei linfociti T. La tecnica citofluorimetrica rimane quindi la metodologia più facilmente utilizzabile anche se, a secondo dell'anticorpo specifico e del fluorocromo utilizzato, si possono ottenere differenti risultati (1). Anche l'utilizzo di diversi tipi di campione (es: linfociti separati o sangue intero) può determinare variabilità analitica.

Scopo. Confrontare le metodiche per l'analisi al citofluorimetro dell'espressione di ZAP-70 utilizzando, come tipo di campione, linfociti separati o sangue intero.

Materiali e metodi: Sono stati indagati 15 soggetti affetti da LLC in cura presso la Divisione di Medicina del nostro ospedale. L'espressione di ZAP-70 è stata testata mediante tecnica citofluorimetrica effettuando per ciascun campione una doppia analisi sia con sangue intero che con linfociti separati testando anche diversi tempi di permeabilizzazione (Fix e Perm) e diverse concentrazioni dell'anticorpo monoclonale coniugato con il fluorocromo AlexaFluor 488 (Caltag laboratories).

Risultati. Dal confronto delle metodiche si è osservato che utilizzando sangue intero è necessario:

- 1) Dopo la permeabilizzazione rimuovere completamente l'emolisi prima dell'aggiunta dell'anticorpo specifico per evitare una sovrastima del valore di ZAP-70 ad essa dovuta;
- 2) Raddoppiare il tempo di incubazione con l'anticorpo antiZAP-70 rispetto alla procedura originaria per permettere la completa saturazione del legame ed evitare una sottostima di ZAP-70;
- 3) Aumentare il numero di lavaggi finali per permettere una buona risoluzione del citogramma.

Conclusioni. Con l'utilizzo di sangue intero devono essere effettuate modifiche procedurali per evitare una sotto o sovrastima del valore della proteina ed ottenere quindi risultati equiparabili a quelli ottenuti con linfociti separati.

Bibliografia. Gibbs G. Clin. and Lab. Haem.2005;27:258-266.

096

SERUM FREE LIGHT CHAINS (sFLC) ASSAY: A POTENTIAL USEFUL MARKER FOR DIAGNOSIS AND EARLY ASSESSMENT OF RESPONSE TO TREATMENT AND RELAPSE IN MULTIPLE MYELOMA (MM), AL AMYLOIDOSIS (AL) AND A PROGNOSTIC FACTOR IN MONOCLONAL GAMMOPATHY OF UNDETERMINED SIG

M. M. Giarin¹, C. Sfiligoi¹, S. Battaglio¹, I. Hila¹, L. Giaccione¹, P. Omedè¹, P. Diana¹, B. Amoroso², M. Boccadoro¹

¹*Aso S. Giovanni Battista, Ematologia 1 Universitaria, Torino*

²*Dir. Scientifica, The Binding Site, Roma*

Introduction. We investigated sFLC role as a useful marker in diagnosis/follow-up of pts with MM and AL. Besides, we evaluated a predictive role of sFLC in the evolution of MGUS.

Methods and Patients (Pts). A non competitive, near-infrared, latex-enhanced immunoassay has been used (Bradwell AR, 2001). SPE, IFE, sFLC and PCC were performed at presentation, post-therapy and relapse, in 20 pts: 5 pts had IIMM, 2 were ipo-IIMM, 4 pts had NSMM, 6 pts had LCMM and 3 pts had AL. Patients were treated with different treatment schedule. We also compared results in 5 pts affected by MGUS who progressed to MM and 7 pts with stable MGUS.

Results. IIMM. Six/1 pts had abnormal sFLC and ratio at diagnosis. In all responsive pts, sFLC fell more rapidly than intact Ig. The two ipo-IIMM pts showed a progressively decreased of sFLC and lower PCC, indicating response to treatment, whereas total Ig were almost unvaried. LCMM: All pts had abnormal sFLC at diagnosis. Follow-up evaluation also revealed a remarkable correlation between sFLC and B₂g. NSMM: At clinical presentation, serum and urine IFE were negative in all pts, while sFLC were abnormal. During follow up, a correlation between sFLC, PCC and clinical events was observed. AL: At presentation, all 3 pts showed abnormal sFLC and ratio with small amounts of B₂g. After therapy a 50% reduction of sFLC correlated with an improvement of organ function. MGUS: Five/7 pts with stable MGUS showed normal sFLC and ratio at diagnosis and at follow-up, 2/7 pts had slightly abnormal sFLC concentrations and ratio at presentation but these changed to normal ratio during follow-up. Four/5 pts with progressing MGUS showed abnormal sFLC and ratio in baseline serum samples; and in 5/5 there was a rapid increase of sFLC and ratio, correlating with progression to MM.

Discussion. The early fall or rise of sFLC (or their ratio) accurately monitored response to therapy and suggested relapse long before any Ig or pBJ variation became apparent; the higher sensitivity is directly correlated to their short half-life (2-6h). sFLC proved to be an useful tool for diagnosis and management of ipo-IIMM, NSMM and AL, and showed a significant correlation with PCC. Abnormal sFLC and ratio were associated with a higher risk of progression in MGUS.

097

VARIABILITA' DELLE COMPONENTI EMOGLOBINICHE NORMALI E PATOLOGICHE DALLA NASCITA ALL'ETA' ADULTAG. Ivaldi¹, D. Leone¹, C. Viaggi¹, D. Pascotto¹¹Lab. di Genetica Umana Sez. Microcitemia, Osp. Galliera, Genova

Il dosaggio delle frazioni emoglobiniche (Hb) umane presenti alla nascita, i cambiamenti nel periodo neonatale e perinatale, il raggiungimento di valori percentuali definitivi tra i sei e i dodici mesi di vita e la variabilità di questi valori in presenza di difetti dei geni globinici o di eventi sporadici ed occasionali rappresentano parametri spesso richiesti dai neonatologi, dai pediatri e dagli ematologi attribuendovi un significato diagnostico e prognostico in corso di anemie emolitiche e non emolitiche.

Gli esami eseguiti mediante dosaggio in HPLC delle componenti emoglobiniche su 3500 soggetti in epoca neo e perinatale e su 10.000 soggetti adulti nel corso di quattro anni di prevenzione delle emoglobinopatie presso il nostro laboratorio ha consentito di ottenere dei risultati che sono stati in parte comparati con quelli disponibili in letteratura (1) e valutati sulla base della loro significatività statistica.

Si è potuto compilare in prima istanza una tabella con i valori variabili dell'Hb A, Hb F e Hb A2 riscontrati alla nascita e a diverse età fino al raggiungimento di un assetto emoglobinico normalizzato; altre cinque tabelle con le stesse modalità si sono potute compilare per i soggetti portatori di trait beta talassemici, Hb S, Hb C, Hb E e Varianti delle catene alfa globiniche.

Le varianti dell'Hb nell'adulto, e anche nel neonato, possono presentare percentuali relative variabili quando vengono coereditate con difetti beta talassemici silenti, beta⁺ e beta⁰, oppure alfa talassemie, persistenze di Hb F (HPFH), delta talassemie o altri difetti strutturali rari (2). Tutti i soggetti esaminati sono stati diagnosticati mediante esami di 1° livello o caratterizzati utilizzando test molecolari specifici (3).

Con il crescente ingresso in Italia di immigrati da Paesi maggiormente a rischio per i difetti Hb, durante gli screening neonatali è sempre più frequente l'osservazione di emoglobinopatie strutturali, soprattutto Hb S e Hb C, e la necessità di valutare gli assetti emoglobinici in presenza di anemie perinatali.

Bibliografia. www. metromedlab. V.Divoky et al. Am.J.Hemat. 42:225-226, 1993. European Molecular Genetics Quality Network (EMQN), 2002

098

OLOTRANSCOBALAMINA COME MARKER PRECOCE DI CARENZA DI VITAMINA B12 IN PAZIENTI CON MIELOFIBROSI IDIOPATICA CRONICAC. Novembrino¹, C. Vener², S. Lonati¹, R. De Giuseppe¹, D. Sansaro¹, V. Uva¹, G. Lunghi³, E. Torresani⁴, G. Lambertenghi Delilieri², F. Bamonti¹¹Dip. Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano²Dip. Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, U.O. Ematologia 1, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano³Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano⁴Lab. Patologia Clinica, Dip. Area Servizi Diagnostici, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

La mielofibrosi idiopatica cronica (CIMF) è una patologia mieloproliferativa caratterizzata da alta incidenza di eventi trombotici e iperomocisteinemia (HHcy). L'HHcy, noto fattore indipendente di rischio per patologie cardiovascolari, può derivare dal deficit di folato e/o cobalamina B12, vitamine metabolicamente correlate all'omocisteina (Hcy).

Nel complesso transcobalamina- B12, chiamato olotranscobalamina (Holo-TC), è presente la quota biologicamente attiva di B12, ovvero quella che entra nella cellula attraverso recettori specifici ubiquitari. Diversi studi clinici hanno dimostrato che il dosaggio delle concentrazioni sieriche di Holo-TC (finora effettuato con metodo RIA), rispetto a quello dei livelli di B12, risulta più indicativo del reale status vitaminico. Per valutare la validità diagnostica di una nuova metodica immunoenzimatica per il dosaggio di Holo-TC (Axis-Shield) su analizzatore AxSYM (Abbott Diagnostics) in 57 campioni ematici di pazienti affetti da CIMF (31M/26F, età 40-84, mediana 66.5) sono stati misurati i livelli di Holo-TC, B12, folato e Hcy, utilizzando i rispettivi kits.

Tutti i pazienti presentavano HHcy. I livelli di folato mostravano un'avvenuta supplementazione che può mascherare un deficit intracellulare di B12. Infatti, nel 44% dei pazienti si evidenziava una concentrazione di Holo-TC inferiore al cut-off malgrado livelli di B12 nella norma.

Pertanto, in pazienti affetti da CIMF l'Holo-TC si dimostra un marker precoce utile sia per individuare una carenza acquisita e conseguente HHcy sia per attuare un intervento terapeutico tempestivo.

Bibliografia. H Refsum et al, Clin Chem 2006;52:129-37

Analiti, campioni	Int. Rif. o cut-off	Media±SD n=57	Media±SD n=25 Holo-TC <35
Holo-TC (pM), siero	>35	49.7±25.2	29.9±7.0
B ₁₂ (pM), siero	170-835	505±235	509±268
s-Fol (nM), siero	7-28	26.9±12.4	28.1±13.3
ery-Fol (nM), sangue	420-1460	1688±1034	1811±1026
Hcy (µM), plasma	<10	11.4±5.7	12.2±6.6

099

RETICULOCYTES MATURATION STAGES DEFINED BY CYTOFLUORIMETRIC ANALYSIS: A NOVEL APPROACH

P. Borrione¹, R. A. Salvo², A. Spaccamiglio², A. Mastrone², G. Piccoli³, D. Baraban¹, A. Angeli¹, M. Pautasso¹

¹A.S.O. San Luigi Gonzaga, Orbassano Torino

²Consorzio Piemontese per la prevenzione e la repressione del doping e di altri usi illeciti dei farmaci, Orbassano Torino

³A.S.O. San Giovanni Battista, Torino

The oxygen transportation from lungs to the other tissues is ensured by erythrocytes which production is controlled by the glycoprotein hormone erythropoietin (EPO). Tissue hypoxia is the only physiological mechanism for increasing erythropoietin production. EPO acts on erythroid progenitor cells in the bone marrow promoting the proliferation, differentiation and preventing them from undergoing programmed cell death.

Reticulocyte maturation into erythrocytes is the final step of erythropoiesis and they reflect the erythrocytic activity of the bone marrow in the peripheral blood.

The reticulocyte count has evolved into one of the basic tests in diagnostic hematology for assessing erythropoietic activity. It is essential for the diagnosis, classification, and treatment monitoring of anemias, for the confirmation of bone marrow regeneration after chemotherapy or transplantation, in the monitoring of hemopoietic restoration during or after erythropoietin treatment and in diagnosis of hematologic diseases, systemic diseases that affect erythrocyte production.

Immature reticulocytes, also called shift or stress cells, normally constitute less than five percent (5%) of the total number of reticulocytes. They contain the greatest quantity of RNA, which nucleases degrade over a period of three days. Young reticulocytes are released into the peripheral blood circulation during periods of intense erythropoietic stimulation.

Previous studies were conducted in our unit on health subjects (volunteer donors) in order to identify the transferrin receptor (CD71) expression on different stage of maturation of the reticulocyte. Reticulocytes has been identified from others erythroid cells using thiazole orange (TO). With this aim we used a flow cytometry method utilizing biparametric analyze TO/CD71. For easily identifying the phenotypic patterns in reticulocytes we defined so-called "empty box" similar dot-plot regions where cells could localize because of their stage of maturation. We defined three empty boxes to divide immature (R4), intermediate (R3) and mature red blood cells (R2). the percentage of reticulocyte, the mean CD71 expression and the mean TO expression in each box were evaluated.

100

L'ANEMIA FALCIFORME: VALUTAZIONE DEI FATTORI DI RISCHIO E STUDIO DI PARAMETRI REOLOGICI

P. Caprari¹, A. Tarzia¹, P. Cianciulli², G. Mojoli³, E. Mannella⁴, M. C. Martorana⁴

¹Dip. Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

²Day Hospital Talassemici, Osp. S. Eugenio, Roma

³Miane, Treviso

⁴Centro Aziendale Produzione Emocomponenti, A.O. S. Camillo - Forlanini, Roma

L'Anemia falciforme è determinata da una mutazione nel gene della β globina che comporta la formazione di emoglobina S (HbS) che, in condizioni di ipossia, gelifica determinando la falcizzazione delle emazie. Si presenta con anemia emolitica cronica, epato-splenomegalia, crisi dolorose ossee, articolari, toraciche, addominali, incidenti cerebro-vascolari. Gli eritrociti a falce irrigiditi circolano con difficoltà nel letto vascolare ostruendolo, innescando fenomeni emolitici e crisi vaso-occlusive seguite da trombosi e infarti. Lo scopo di questo lavoro è quello di studiare il profilo emoreologico e coagulativo ed il danno ossidativo in pazienti affetti da anemia falciforme per valutare i fattori di rischio che predispongono alle crisi vaso-occlusive.

Metodi. Sono stati esaminati 10 pazienti di cui 5 trasfusione-dipendenti (TD) (n.2 HbS/HbS; n.3 HbS/Tal) e 5 non trasfusione-dipendenti (NTD) (n.1 HbS/HbS; n.4 HbS/Tal). E' stato effettuato uno studio del profilo coagulativo (PT, FBG, APTT, Fattori II, V, VII, VIII:c, IX, X, XI, XII, vWF:Ag, LAC, APC-R, PC, PS, ATIII) associato ad uno studio genetico di F. II, V Leiden, HPA1a/b, ApoB e mutazioni per MTHFR (C677T e A1298C). Il danno ossidativo eritrocitario è stato valutato mediante studi metabolici e strutturali ed il profilo emoreologico determinando la viscosità ematica e la deformabilità eritrocitaria con viscosimetro rotazionale RV-20 con sistema di misura CV-100 e ME31 (HAAKE).

Risultati e Conclusioni. La doppia eterozigosi HbS/Tal risulta più grave nei pazienti che, oltre al gene per l'HbS, presentano il gene per la β^0 Tal rispetto ai soggetti portatori di β^+ Tal. Il profilo coagulativo mostra uno stato trombofilico acquisito, in particolare nei pazienti TD, con una significativa frequenza di difetti congeniti a rischio trombotico. Si evidenzia un danno eritrocitario a carico del membrano-scheletro nei TD, mentre le attività metaboliche risultano elevate nei NTD. In tutti i pazienti il profilo emoreologico risulta alterato e correlabile con lo stato clinico. Le modificazioni del profilo fluidodinamico per i pazienti sottoposti a trasfusione denotano scostamenti dalla norma più ridotti, a conferma dei buoni risultati delle terapie.

101

APPLICAZIONE DI UNA NUOVA METODICA PER IL DOSAGGIO DEL PTH-INTATTO IN FASE INTRA-OPERATORIA

F. Balboni¹, B. Morrocchi¹, A. Salati¹, V. Vitale¹, A. Occhioni², R. Artusi², C. Sartori³, D. Di Martino³, P. Cicchi²

¹Laboratorio Analisi IFCA

²S.O. Chirurgia IFCA

³Diasorin Spa Saluggia VC

Un efficace strumento diagnostico per il monitoraggio intra-operatorio della paratiroidectomia è il dosaggio del PTH Intatto (iPTH).

In commercio è disponibile una metodica ad incubazione rapida (Futura Diagnostika, PANTEC, Milano) che permette il dosaggio in 8 minuti con l'uso di uno strumento dedicato.

La Ns. struttura fino ad oggi si era avvalsa del laboratorio di un vicino ospedale con tempi di risposta di almeno 90 minuti, e con costi molto elevati (personale e mezzi dedicati al trasporto refrigerato, costo analitico del dosaggio nella struttura convenzionata).

L'acquisizione dello strumento LIAISON DIASORIN nel Ns. Laboratorio, ci ha permesso di valutare l'utilizzo di un nuovo test, normalmente validato per l'uso routinario, eseguibile in 32 minuti, in chemiluminescenza di tipo sandwich diretto (CLIA).

Scopo del lavoro, è stato determinarne la validità clinica in contesto intra-operatorio al fine di recuperare i tempi ed i costi e cosa più importante avere le prime risposte prima degli ultimi prelievi.

A tal fine sono stati presi in considerazione 10 pazienti sottoposti a paratiroidectomia per iperparatiroidismo primario; in tutti i pazienti la diagnosi è stata effettuata mediante esami di laboratorio (calcemia, iPTH) e test di localizzazione (eco e scintigrafia).

Considerando che il tempo medio di refertazione del test dal momento del prelievo è stato di 38 minuti, tale procedura ha ricevuto la completa validazione clinica; infatti tutti gli interventi si sono conclusi efficacemente con il riscontro del dato biochimico.

Evidenziamo anche un caso in cui all'exeresi condotta su indicazione "falsamente positiva" di eco e scintigrafia, non ha corrisposto una variazione significativa del PTH; si è pertanto protratta l'esplorazione fino al reperimento in sede anomala dell'adenoma, alla cui asportazione ha fatto seguito un calo significativo del PTH. Solo l'esecuzione del iPTH all'interno della struttura ha permesso di eseguire un'ulteriore serie di dosaggi.

I dati ottenuti durante gli interventi, e quelli seguenti al breve follow-up dei pazienti (60 gg.), servono a dimostrare la validità clinica del dosaggio in un contesto intra-operatorio, laddove non si possa utilizzare il test rapido.

Bibliografia. S.K.Libatti et al Surgery; 126: 1145-1151

102

DOSAGGIO DEL PTH IN PAZIENTI DIALIZZATI: CONFRONTO TRA METODI

F. Balboni¹, G. Del Frate³, R. Bruzzi³, A. Pierami³, V. Vitale¹, M. Gallo², V. Montemurro², A. Del Genovese³

¹Laboratorio Analisi IFCA

²U.O. Emodialisi IFCA

³Laboratorio Analisi Biochimico-Cliniche e Microbiologiche ASL1

Introduzione. L'iperparatiroidismo secondario è una complicanza dell'insufficienza renale cronica (IRC), ed il dosaggio del PTH è raccomandato dalle Linee Guida della Società Italiana di Nefrologia. Nei pazienti con IRC è importante monitorare i livelli di PTH biologicamente attivo utilizzando metodi che limitino le interferenze dei frammenti, specialmente quelli C-terminali che sono di incerto significato clinico. Nei pazienti con IRC essi si accumulano in concentrazioni molto elevate.

Materiali e Metodi. 43 campioni di plasma EDTA di pazienti dializzati sono stati centrifugati entro 30 minuti e congelati a -20°C. I dosaggi di PTH sono stati eseguiti con metodo radioimmunologico IRMA DiaSorin® e con due metodi chemiluminescenti CLIA su analizzatore DiaSorin Liaison® e su Immulite 2000 della Medical Systems®. Le tre metodiche utilizzano anticorpi specifici per due regioni diverse della molecola di PTH. Il metodo IRMA N-TACT utilizza un anticorpo policlonale contro la regione 39-84 legato in fase solida, e un secondo anticorpo specifico per la regione 1-34 marcato con iodio-125. Il test CLIA Liaison® utilizza gli stessi anticorpi del metodo IRMA. Il dosaggio Immulite PHT intatto della Medical Systems® utilizza un anticorpo diretto contro la regione N-terminale 1-34 e uno per la regione C-terminale 44-84.

Risultati. La correlazione di Pearson evidenzia un buon accordo fra le metodiche IRMA, presa da noi come riferimento, e IMMULITE ($r=0.975$) e fra IRMA e CLIA ($r=0.965$). L'analisi di Bland Altman evidenzia una differenza media di 27.34 pg/ml fra IRMA e CLIA e di 276.58 pg/ml fra IRMA e IMMULITE. La differenza media percentuale è rispettivamente del 14.10% e dell'85.50%. Le metodiche IMMULITE e CLIA hanno una differenza media di 245.46 pg/ml e percentuale di 73.60%. L'analisi di Bland Altman evidenzia anche un notevole scostamento fra le metodiche IRMA e CLIA rispetto a IMMULITE.

Conclusioni. Lo scostamento del metodo IMMULITE rispetto al metodo IRMA mostra una netta sovrastima, e questo può essere l'effetto dell'interferenza dei frammenti C terminali. Il metodo CLIA si correla molto più strettamente al metodo IRMA e in più ha il vantaggio di essere automatizzato.

Bibliografia. Stefano A. Santini et al. Clin Chem; 50:1247-1250

103

INTRAOPERATIVE TESTING FOR PARATHYROID HORMONE

A. Barassi¹, W. Porreca¹, M. L. Biondi¹, A. Bordoni¹, L. De Pasquale², A. Bastagli², G. V. Melzi d'Eril¹

¹Lab. di Analisi, Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Osp. San Paolo, Università degli Studi di Milano

²Unità di Chirurgia Endocrina, Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Osp. San Paolo, Università degli Studi di Milano

Background. Intraoperative PTH testing has proven to be an accurate method to verify the removal of all pathological parathyroid tissue in primary hyperparathyroidism. The intraoperative PTH dosage can be performed either in the central laboratory or in the operating suite. This work analyses data pertaining to the performance of intraoperative PTH dosage in the central laboratory as well as advantage and disadvantage of the procedure. **Patients and methods.** Fiftyfour patients underwent parathyroidectomy with intraoperative dosage of PTH. Three blood samples collected in K3-EDTA were taken from each patient: the first after the induction of anaesthesia, the second and the third after 5 and 10 min after parathyroidectomy, respectively. The samples were sent to the central laboratory and analysed simultaneously. The electrochemiluminescence immunoassay "ECLIA" (intact-PTH; Roche Diagnostics) performed on an Elecsys-2010 analyzer used for PTH measurement. The reference range of the assay was 15-65 pg/mL and the total imprecision was 5.9% at a PTH concentration of 1.8 pg/mL and 4.3% at 11.7 pg/mL, respectively.

Results. 98.1% of patients resulted recovered (average follow-up 31.1 months). Considering a decrease of PTH level <50% from basal value at 10 min after parathyroidectomy as significant, the procedure had one false positive and three false negatives.

Conclusion. The main disadvantage of the presented procedure is the lengthy waiting time. Considering that a waiting time of 10 min is needed after a parathyroidectomy in order to take the last sample for PTH dosage, and an average result processing time of 25 min, the total waiting time is 35 min. It is comparable to that required for results from intraoperative histological examination (estimated at 25-30 min), which is the only alternative to determine surgery effectiveness. The advantage of intraoperative PTH performed in the central laboratory is its very low cost (€ 5.2 for a single test). If histological examination processing time and cost (€ 150 for a single histological exam) are taken into consideration, intraoperative dosage of PTH at the central laboratory may be deemed a viable alternative to the dosage in the operating suite.

Reference. Sokoll LJ, et al. Clin Chem. 2004;50:1126-35.

104

IMPROVEMENT OF SERUM INHIBIN B LEVELS AND SEMINAL PARAMETERS AFTER VARICOCELE SCLEROTHERAPY

A. Bertagna¹, C. Di Bisceglie¹, F. Lanfranco¹, A. M. Barberis¹, L. Zurzolo¹, C. Manieri¹

¹Lab. di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Dip. di Medicina Interna, Università di Torino, Osp. Molinette

Serum levels of inhibin B may be reduced in male patients with different causes of spermatogenic failure. Varicocele may be associated with a reduction of sperm parameters and infertility. The aim of this study was to evaluate the effect of varicocele sclerotherapy on endocrine and seminal parameters.

Methods. Fifteen patients with left varicocele (age, mean±SEM, 25.9±1.4 yr) who underwent spermatic vein phlebography and percutaneous retrograde sclerotherapy with Aethoxysclerol were studied. Serum inhibin B, FSH, total testosterone levels and seminal parameters were evaluated in basal conditions (6 months before and at the moment of sclerotherapy) and 6 months after treatment.

Results. No significant difference of hormonal and seminal parameters was observed 6 months before and at the moment of sclerotherapy. A significant increase of serum inhibin B levels and a significant decrease of FSH levels were observed after varicocele sclerotherapy (mean±SEM, 149.7±19.5 vs 171.8±24.4 pg/ml, p<0.05; 5.6±1.0 vs 4.5±0.6 mIU/ml, p<0.05, respectively); no significant change of serum testosterone levels was observed. After treatment semen analysis showed a significant improvement of sperm concentration (43.8±9.2 vs 61.8±14.2 million/ml, p<0.05) and progressive motility (36.0±4.9 vs 46.3±5.8%, p<0.05); no significant change of sperm normal morphology was observed.

Conclusions. Inhibin B may be really considered an important parameter of gonadal function: varicocele sclerotherapy improves its levels and seminal parameters, confirming the positive effect on spermatogenesis and Sertoli cell function.

105

MODIFICATION OF HORMONAL AND SEMINAL PARAMETERS DURING HCV INFECTION TREATMENT

A. Bertagna¹, C. Di Bisceglie¹, M. Durazzo², A. Premoli², E. Fagà², A. M. Barberis¹, M. Taliano¹, A. Gariano¹, C. Manieri¹

¹Lab. di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Dip. di Medicina Interna, Università di Torino, Osp. Molinette

²Dip. di Medicina Interna, Università di Torino, Osp. Molinette

Hepatitis C virus (HCV) may induce extra-hepatic, mostly immuno-mediated, manifestations. It is unclear if HCV infection itself can affect spermatogenesis and, thus, hormonal and/or seminal parameters. Our preliminary data showed that HCV infection can impair sperm progressive motility and morphology. The aim of our study was to evaluate seminal parameters and reproductive hormones in young subjects with chronic HCV infection before and during antiviral treatment.

Methods. We studied 9 male patients aged 34.9 ± 2.3 yr (mean \pm SD) with chronic hepatitis C before and after six and twelve months of peg-interferon and ribavirine treatment. Active viral replication and increased transaminases (1.5-4 X) were present in all patients. Serum inhibin B, FSH, LH, total and free testosterone, estradiol, prolactin levels, and sperm concentration, total count, progressive motility and morphology (WHO, 1999) were evaluated.

Results. Compared to the basal condition, after six months of treatment sperm concentration, total count and progressive motility were unchanged, but there was a remarkable reduction of normal morphology (20.1 ± 11.6 vs $27.9 \pm 10.3\%$, $p < 0.05$) in all patients. On the contrary, inhibin B levels were increased in 89% of patients (163.1 ± 55.9 vs 105.5 ± 48.2 pg/ml, $p = 0.01$); the other hormonal parameters were unchanged after six months of treatment. After twelve months, sperm total count showed a significant reduction compared to basal values (151.8 ± 120.8 vs 270.8 ± 255.9 million/ejaculate, $p < 0.05$), without significant variations of the other seminal and hormonal parameters.

Conclusions. This study shows that HCV infection treatment could cause a worsening of the seminal parameters. The inhibin B levels increase after six months of treatment seems to suggest an attempt to restore the spermatogenesis in relation to the viral clearance. However, the data after twelve months show that the iatrogenic effect of the antiviral treatment seems to be more incisive on spermatogenesis than the beneficial effect of the viral clearance.

Reference. World Health Organization (1999) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

106

IL DOSAGGIO DEL PARATORMONE INTRAOPERATORIO: QUANDO FERMARSI?

C. Carrozza¹, E. Di Stasio¹, S. Lancellotti¹, F. Iavarone¹, S. D'Alia¹, C. Zuppi¹

¹Ist. di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

La procedura di paratiroidectomia classica, che prevede la rimozione della ghiandola adenomatosa previa visualizzazione di tutte le paratiroidi, sta andando incontro ad una progressiva sostituzione con tecniche mini-invasive coadiuvate dalla localizzazione radiologica preoperatoria e dalla valutazione del decadimento intraoperatorio del PTH a conferma dell'avvenuta rimozione del tessuto iperfunzionante. I criteri più diffusamente applicati per valutare la adeguata diminuzione del PTH prevedono un decremento $>50\%$ rispetto al valore più elevato pre-incisione o pre-escissione a 10 minuti dopo ablazione della ghiandola sospetta (criteri di Miami). Pur consentendo la corretta predizione dei livelli di calcio post-operatori, indice dell'attività paratiroidea residua, in un elevato numero di casi, il rilevamento di decadimenti anomali del PTH è spesso fonte di dubbio sulla necessità della prosecuzione della seduta operatoria alla ricerca di adenomi multipli o sedi ectopiche.

Nel presente studio sono stati valutati (145 pazienti) differenti combinazioni di tempi (5-20 min), concentrazioni di riferimento per determinare l'entità del decremento del PTH, profili cinetici del decadimento e livelli residui di PTH, per predire retrospettivamente l'esito dell'intervento. L'analisi dei dati ha evidenziato un significativo aumento della corretta possibilità di predizione, in particolare nei casi di malattia multighiandolare, analizzando i predetti parametri a 20' rispetto che a 5' o 10'. L'applicazione dei criteri di Miami avrebbe consentito, nella popolazione in esame, l'identificazione di solo 2/7 pazienti con malattia multighiandolare rispetto al 100% evidenziabili con l'utilizzo dei criteri a 20 minuti precedentemente descritti. Pertanto, una valutazione critica di tali elementi potrebbe consentire di migliorare i risultati ottenibili con tecnica mini-invasiva garantendo una resezione mirata di tutto il tessuto iperfunzionante soprattutto nei casi in cui l'inquadramento radiologico preoperatorio non consenta una univoca diagnosi e localizzazione delle ghiandole iperplastiche.

Bibliografia. Di Stasio et al. submitted to Clin. Chem.

107

COMPARISON BETWEEN TWO TSH ASSAYS (IMMUNORADIOMETRIC-IRMA E IMMUNOFLUORESCENT-EIA) IN AUTOIMMUNE THYROIDITIS (TA) WITH AND WITHOUT THYROID DYSFUNCTION

F. M. Lattanzio¹, P. Ranieti², A. De Remigis², B. Di Nenno², S. Matera¹, B. De Laurentis¹, L. Vianale², P. De Remigis²

¹Lab. Patologia Clinica II, Policlinico SS. Annunziata, Chieti

²U.O. Endocrinologia, Policlinico SS. Annunziata, Chieti

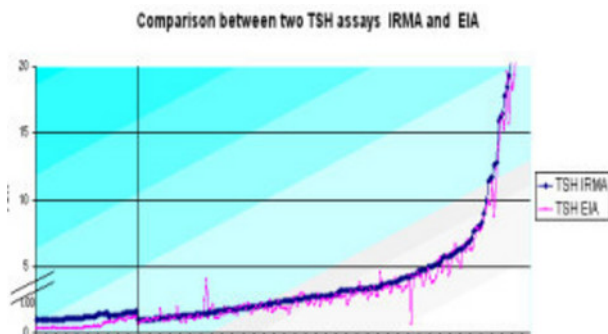
TSH plays a pivotal role in thyroid functional disease (FTD) diagnosis. Alone it is enough to rule out a FTD, if normal or to diagnose primary hypothyroidism (PH) when elevated, thyrotoxicosis (T) if low (rare exceptions). Moreover TSH is important in diagnosing subclinical forms of FTD (normal thyroid hormones and alone high TSH). For this purpose we studied the differences between two methods, IRMA and EIA in a affected TA population.

Methods. 243 TA affected subjects were considered. TSH was assayed in the same blood sample with IRMA and EIA method, AbTG with IRMA, AbTPO in RIA. From functional point of view a TA type I (eucrine) was shown in 142 subjects, a TA type II (PH associated) was demonstrated in 52 (26 were subclinical), while a TA type III (T associated) was shown in 49 people (29 were latent). A correlation statistical analysis of T-student for pair-data.

Results. The two curves are reported (fig). Beside IRMA values were more elevated than EIA ones, no statistical differences were shown between two TSH methods, in the normal TSH range and in patent and subclinical PH and subclinical T interval, while the differences are significant in the range of TSH < to 0.01 mU/ml.

Conclusions. TSH is a powerful tool to diagnose FTD. Small variations may move a subject from an area of normal TSH values to pathological TSH levels, in subclinical phase. Therefore the accuracy of methods is very important. The two TSH assay comparison revealed an overlapping between different methods, except in the TSH range below of 0.01 mU/ml, where a different sensitivity of methods may make the difference.

Reference. ATA guidelines Arch Intern Med 2000;160:1573-1575.



108

CORRELATION OF ANTITHYROID ANTIBODIES VERSUS ERYTHROCYTE SEDIMENTATION RATE(ESR) AND REACTIVE-C-PROTEIN (RCP)

F. M. Lattanzio¹, P. Ranieri², A. De Remigis², B. Di Nenno², S. Matera¹, B. De Laurentis¹, M. Lancellotti¹, L. Vianale², P. De Remigis²

¹Lab. Patologia Clinica II, Policlinico SS. Annunziata, Chieti

²U.O. Endocrinologia, Policlinico SS. Annunziata, Chieti

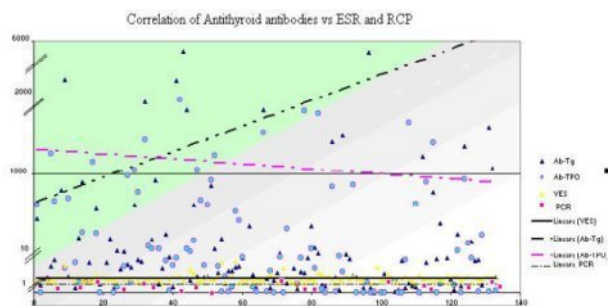
ESR and RCP are indexes of flogosis, where ESR represents a more aspecific parameter. In autoimmunity process, although the mechanisms underlie are complex, a key role is played by involvement of cell-mediated immunity, that drives to the activation of different branches correlated to it, for example cytokine system. In this direction more branches may be presumed to be activated, as flogistic process. Therefore Antithyroid Antibodies (AA) were correlated to ESR and RCP, in a group of Autoimmune Thyroiditis (AT) subjects, in order to verify an activation of inflammatory phenomenon.

Methods. 143 AT affected subjects were considered, 126 female gender and 17 male, ranged form 20 to 75 years (mean age 50.3 yr). AbTg were assayed with IRMA and AbTPO with RIA (Biocode-commercial kits).

Results. ESR values are variable between 4 and 70 mm/h, RCP values from 0.32 to 4.36 mg/dl. All people presented elevated AA, one or both, with levels ranged for AbTg from 1 to 6495 and for AbTPO from 1 to 1750.. No relationship was shown between AA and ESR on one side and between AA and Reactive- C-Protein on other side (figure below).

Conclusions. 1- ERS and RCP are not elevated in AT. 2- Immunologic alterations that underlie to autoimmune thyreopathy don't seem to activate flogistic process 3- 13 subjects with high ESR (more than 25 mm/h) show also high titre of Reactive- C-Protein, demonstrating a coexisting inflammatory process.

In conclusion our results show that in autoimmune Thyroiditis the flogistic process are not activated and high ESR should suggest a contemporary inflammatory state. Reference. Kuby Immunology 4th Edition FREEMAN WH COMPANY Ed.



109

LA FASE PREANALITICA NEL DOSAGGIO DEL BI TEST

G. Magri¹, E. Baghino¹

¹Lab. Analisi Osp. Civ. di Imperia

Scopi. E' chiara l'importanza della fase preanalitica nell'aneuploidia fetale, per un dato di laboratorio che correttamente può essere applicato alla clinica. Abbiamo voluto rilevare se in dosaggi successivi e in condizioni preanalitiche differenti la free b HCG e la PAPP-A presentino variazioni significative.

Metodologia. I dati da confrontare sono stati ottenuti dosando la free b HCG e la PAPP-A dopo un'ora dalla centrifugazione e nella serie dei successivi dosaggi alle 24, 72, 96, 120 ore, ottenendo CV % medi fra le determinazioni nella serie delle aliquote mantenute a T 22°C, a 5°C e a -20°C in due successivi scongelamenti. Si sono considerati 28 Pz. con età media di 32 anni e datazione ecografica media pari a 12 settimane e 2 giorni. I prelievi sono stati centrifugati dopo un'ora e conservati; sono stati dosati la " free b HCG e PAPP-A" con reattivi della DPC su Immulite 2000. L'aliquota a 22°C dosata dopo un'ora dalla centrifugazione è il riferimento T0. L'aliquota a 5°C e quella a 22°C sono state ridosate dopo 24, 72, 96, 120 ore dalla centrifugazione. L'aliquota a -22°C è stata scongelata e dosata dopo 96 ore, quindi ricongelata e scongelata dopo 120 ore e ridosata.

Risultati. Sono stati calcolati i CV tra i vari dosaggi nella serie e il T0, a questo valore si è sottratto il CV totale della macchina ricavato dai valori del controllo di qualità per la free b HCG e la PAPP-A. Si evidenzia che: il CV del dosaggio a 22°C è tra 13.7% e 26.5% talmente elevato da non permettere alcuna operatività. Alla T di 5°C si nota un CV che varia per la free b HCG tra 1.4% e 3.1%, per la PAPP-A tra 2.4% e 2.9%. Alla T di -20°C si nota un CV che varia per la free b HCG tra 2.8% e 3.3%, per la PAPP-A tra 4.1% e 4.5%.

Conclusioni. E' evidente che le condizioni migliori di conservazione sono a T 5°C, mentre a T-22°C si ha un'identità di valori per la free b HCG nel primo scongelamento ma una diversità per la PAPP-A. Dovendo scegliere per entrambi i dosaggi un unico metodo, è chiaro che la scelta migliore ricade sulla conservazione dei campioni in frigorifero.

Bibliografia. Franzini C. Migliore valutazione dei risultati di laboratorio. Fed Med 1994;7:199-203

110

HAEMATO-CHEMICAL OBESITY MARKERS IN AN OVERWEIGHT CHILD POPULATION

G. Tamaro¹, M. Donato¹, S. Parco¹, G. Tonini¹

¹IRCCS Burlo Garofolo, Trieste

Obesity is starting to be considered as a proper pathology common in countries of high living standards. It is the cause not only of problems of esthetical relevance; obese subjects are at high risk for cardiovascular diseases, also they present alterations in bone and muscular development and in the sexual sphere. In the recent literature there have been indications of serum markers that are specific to this pathology, and in particular leptin and adiponectin two cytokines that are being considered as two neuro-hormones. We wished to study them in a pediatric population (64F +37M) of average age 10 years (range 5-18) and with a body mass index above 40.

The dosage has been conducted with the kit ELISA: Leptine DRG and Adiponectin Bio Vendor on an ADALTIIS analyzer.

Results have demonstrated a high number of pathological values:

- among males values for leptin were above normal in the 45,21% of cases and adiponectin was below normal in 43,34% of cases.

- Among females leptin had increased in 78,13% of cases and adiponectin had diminished in 62% of cases.

This evidence was even more frequent in obese subjects with steatosis: in all females (n=8) leptin resulted above normal and adiponectin below; in males (n=15) this concomitance was present in 66% of the cases.

In subjects with insuline-resistance the percentages of pathologic values for both markers were F=79% and M=37% respectively.

To conclude, our data confirms the usefulness of leptin and adiponectin dosage in obese subjects in pediatric age, particularly among females, also as a signal of the development of other pathologies (steatosis, insuline-resistance), associated only to significant overweight.

Reference. R. S. Ahima and S.Y. Osei: Neuroendocrine regulation of appetite and energy balance. Diabetes. 2002, 9:215-223.

111

PLATELET ACTIVATION AND GLYCOPROTEIN IIb/IIIa PIA2 HOMOZYGOSITY PREDICTS RISK OF RECURRENT ISCHEMIC EVENTS AFTER PERCUTANEOUS CORONARY ANGIOPLASTYE. Volpi¹, C. Federici¹, J. Gianetti¹, S. Manfredi¹, N. Botto¹, A. Clerico¹, M. G. Andreassi¹¹Laboratory of Cellular Biology and Genetics, CNR-Institute of Clinical Physiology, G. Pasquinucci Hospital, Massa, Italy

Background. Recently, platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism PIA1/A2 has been associated to affect antiplatelet aspirin response and, thus, contribute to so-called aspirin resistance.

Aims: To investigate the relation between the aspirin resistance and the platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism and the recurrence of coronary events after percutaneous coronary intervention (PCI).

Methods. We enrolled 78 consecutive patients underwent PCI and prospectively followed up for a mean period of 11.6±5.6 months. Aspirin resistance, evaluated around 30 hours after PCI, was defined as a collagen-epinephrine closure time (CEPI-CT) >190 sec by Platelet Function Analyzer (PFA-100). PIA1/A2 polymorphism was determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length (RFLP) methods. We stratified the patients in accordance to both the condition of aspirin resistance and to the PIA1/A2 polymorphism.

Results. The prevalence of aspirin resistance was 53.8% (n=42). CEPI-CT<190 (HR=3.9; 95% CI, 1.07-14.17), diabetes 2 (HR=3.1; 95% CI, 1.04-9.23, p=0.04), PIA2 genotype (HR=2.9; 95% CI, 1.0-8.7, p=0.05) were associated with a higher rate of clinical recurrence. No correlation was found between the CEPI-CT and the PIA1/A2 polymorphism. After adjustment for other risk factors, CEPI-CT<190 and PIA2 genotype remained the only independent predictors of cardiac events (Table).

Conclusion. PI(A2) polymorphism is an independent predictor of a worst clinical outcome after PCI, but it is not associated to antiplatelet aspirin response.

Predictors	HR (95% CI)	P value
Diabetes 2	2.5 (0.8-7.7)	0.09
CEPI-CT<190	4.3 (1.2-15.9)	0.03
PIA2	3.25 (1.06-10.0)	0.04

112

SURFACE-ACTIVATED CHEMICAL IONIZATION AND HIGH FLOW GRADIENT CHROMATOGRAPHY IN THE ANALYSIS OF TACROLIMUS IN BLOOD SAMPLESS. Cristoni¹, M. Brambilla², E. Gonella², P. M. Gerthoux², P. Mocarelli²¹University of Milan, Center for Bio-molecular Interdisciplinary Studies and Industrial Applications, CISI²University Department of Laboratory Medicine, Hospital of Desio

Introduction. Tacrolimus was analysed in blood samples using Surface-Activated Chemical Ionization (SACI) coupled to liquid chromatography.

Aim. A high flow gradient chromatography approach was used in order to avoid the co-elution of analyte and biological matrix compounds that led to quantitation errors due to matrix effect.

Methods. 15 different blood samples were treated with CH₃CN in order to precipitate proteins, then were centrifugated and supernatant was recovered. Ascomycin was used as internal standard. To quantitate tacrolimus a calibration curve was built using 8 standard blood samples, with a tacrolimus concentration of 0.01, 0.1, 2.1, 5, 10.8, 15.9, 21.9 and 38.8 ng/mL. The APCI, no-discharge APCI and SACI mass spectra were obtained using a LTQ mass spectrometer. LC-SACI mass chromatograms were obtained using SRM-MS/MS approach and the same samples were analysed using both the isocratic and high flow gradient chromatographic approaches.

Results. In the case of SACI an increase in sensitivity was observed in comparison to no-discharge APCI: this was due to the better focalization of analyte ions inside the mass spectrometer, the low production of solvent charged species but most of all the activated ionization effect of the surface that led to increase the signal intensity. In the case of high flow gradient chromatography both tacrolimus and ascomycin areas and area ratios exhibited a high stability and this phenomenon was also confirmed by the % accuracy among the analyte and internal standard area ratios.

Conclusions. Various approaches were developed to quantify tacrolimus in plasma by using both immunoassay and liquid chromatography-Electrospray, but the matrix effect problems encountered in the analysis of this compound might lead to quantitation errors working in isocratic conditions. This problem was resolved with high flow gradient chromatography coupled to SACI, wich permitted a strong matrix effect reduction.

Reference. Lensmeyer et al. "Therapeutic monitoring of tacrolimus concentration in blood: semi-automated extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry", Therapeutic Drug Monitoring, 2001,23(3):239-249

113

DETERMINAZIONE DI TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT) TRAMITE IMMUNOTURBIDIMETRIA (%CDT TIA), CROMATOGRAFIA LIQUIDA HPLC ED ELETTROFORESI CAPILLARE (CZE)

C. Canali¹, M. Filocamo², A. Scognamiglio¹, F. Giovannini¹, T. Trenti¹

¹Lab. Tossicologia, Modena

²Medicina di Lab. Rimini

La determinazione di CDT risulta essere l'unico marker biochimico indiretto per la diagnosi di abuso cronico di alcol. Pur essendo utilizzato nel campo della diagnostica tossicologica, riveste un ruolo di fondamentale importanza nell'ambito della medicina forense e la sua determinazione deve soddisfare precisi criteri di accuratezza diagnostica. Lo studio si propone di confrontare tre diverse tecniche analitiche utilizzate nella determinazione di CDT: immunoturbidimetria (%CDT TIA), cromatografia (HPLC), elettroforesi capillare (CZE). Sono stati analizzati 108 pazienti sospettati di essere abusatori cronici di alcol. Per la determinazione immunoassay è stato utilizzato il kit %CDT TIA (Biorad). La determinazione HPLC è stata eseguita con kit %CDT HPLC (Biorad). Le analisi in CZE sono state condotte con PACE MDQ Beckman Coulter. Per le determinazioni CZE ed HPLC il valore di CDT è stato calcolato facendo il rapporto tra le forme di- e tetrasialo della transferrina, con metodica %CDT TIA il risultato è espresso come percentuale di CDT rispetto alla transferrina totale. Il cut-off usato è 2.5% per CZE, 3% per TIA e 2% per il metodo HPLC.

La media dei risultati è 3.56 ± 1.26 per CDT TIA immunoassay, 2.49 ± 1.51 per HPLC e 2.81 ± 2.00 per CZE. È stata trovata un'alta correlazione tra i risultati ottenuti con i metodi HPLC e CZE $r=0.9022$; $y=1.1657x-0.0897$ ($p<0.001$). Una significativa correlazione è stata anche trovata comparando il metodo HPLC e %CDT TIA, tra %CDT TIA ed CZE: $r=0.72$; $y=0.708x+1.7962$ ($P<0.001$) e $r=0.6534$; $y=1.1888x-1.418$ ($p<0.001$) rispettivamente. È necessario notare che 24 pazienti positivi con il metodo CDT TIA sono risultati negativi con il metodo CZE, similmente 28 pazienti trovati positivi con CDT TIA sono risultati negativi con il metodo HPLC.

I tre metodi di valutazione mostrano di avere una correlazione significativa e possono essere utilizzati nella pratica clinica ma se il dato fornito è richiesto per scopi amministrativi o medico-legali può risultare poco accurato. In questi casi l'uso di una conferma con CZE o HPLC appare necessaria.

Bibliografia. Arndt T., "Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis and interpretation", Clin.Chem., 47 (2001), 13-27.

114

UTILIZZO DEL RAPPORTO BUPRENORFINA URINARIA / CREATININA IN CORSO DI TERAPIA FARMACOLOGICA

G. Cangiano¹, C. Esempio², M. Russo¹, F. Forte¹, A. Latte¹, M. D'Amora³, A. Risitano¹

¹U.O. Lab. Patologia Clinica, P.O. dei Pellegrini, ASL NA1

²U.O. Sert, Distretto 50, ASL NA 1

³U.O. Lab. Patologia Clinica, P.O. degli Incurabili, ASL NA1

Il nuovo e veloce dosaggio immunoenzimatico CEDIA della buprenorfina (BUP) urinaria, rapportato al valore della creatinuria (CREA), sembra dare delle utili indicazioni sull'assunzione sub-linguale del farmaco oppioide (Subutex) somministrato presso i Servizi Tossicodipendenze (SERT).

Il dosaggio cinetico di BUP (lettura tra i cicli 24 e 27 alla lunghezza d'onda di 570 nm) viene effettuato sull'analizzatore AU 400 della ditta Olympus con un'unica calibrazione a 5 punti (poligonale - 5AB) e precisamente 0, 5, 20, 50 e 75 ng/mL.

Concentrazioni fino a 1500 ng/mL di BUP vengono rilevate utilizzando la metodica urinaria (prediluizione automatica 1:20 dell'urina).

I dati preliminari raccolti nel periodo maggio-giugno 2005 sono stati ampliati con uno studio semestrale (dicembre 2005-maggio 2006) condotto su alcuni pazienti, afferenti al SERT del Distretto 50 dell'ASL NA 1.

Il rapporto BUP urinaria/CREA si riferisce a campioni urinari di 27 iscritti monitorati nel tempo e sottoposti a somministrazione di 2, 4, 8 e 16 mg di BUP.

I range di riferimento per fascia di somministrazione si ricavano con il 2,5° ed il 97,5° percentile rispettivamente per i limiti inferiori e superiori.

Si è riscontrato quanto segue: in 3 pazienti trattati con 2 mg di oppioide i rapporti BUP urinaria (ng)/CREA (mg) sono compresi tra 17,9 ed 80,4. Tale rapporto è invece compreso tra 80,2 e 307,5 in 8 pazienti con somministrazione di 4 mg. E ancora in 9 pazienti trattati con una dose di 8 mg di BUP si riscontrano valori compresi tra 189,1 e 446,6. Elevando poi la dose del farmaco a 16 mg, in 7 pazienti l'intervallo del suddetto rapporto è compreso tra 394,8 e 642,5.

L'analisi dei dati mette in evidenza degli elevati rapporti BUP urinaria / CREA ottenuti con campioni urinari molto diluiti (CREA < 40 mg/dL).

Identica rilevazione si ha in caso di aumentata assunzione del farmaco.

Gli intervalli di riferimento sopra citati sono puramente indicativi; è invece di grande utilità il dato che emerge dal rapporto BUP urinaria / CREA nel singolo soggetto monitorato nel tempo.

Bibliografia. Latte A., Cangiano G. et Al. Determinazione della buprenorfina urinaria su AU 400 Olympus e proposta di range di riferimento in corso di terapia. Biochim. Clin., 2005, vol. 29, n.2: 186.

115

CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN THE EVALUATION OF IMMUNOSUPPRESSORS: DOSAGE OF MOPHETYL MYCOPHENOLATE

F. Carlucci¹, M. Anzini², M. Roviello², D. Cattaneo³, S. Merlini³, F. Rosi¹, A. Tabucchi¹

¹Dip. di Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Univ. di Siena

²Dip. Farmaco-Chimico-Tecnologico, Univ. di Siena

³Dip. di Medicina e Trapianti, Osp. Riuniti di Bergamo, Ist. di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Bergamo

Background. Mycophenolic acid (MPA) is the active compound formed following the administration of the pro-drug mycophenolate mofetil (MMF). Recently it has been introduced as immunosuppressive agent, in combination with Cyclosporine and Tacrolimus. The drug has been tested extensively in renal transplant patients and has been shown to be effective in reducing the incidence of acute graft rejection. MMF has now largely supplanted azathioprine.

MPA is a selective, reversible non-competitive inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMP-DH), isoform II, which is a critical enzyme for the de-novo synthesis of guanosine nucleotides. IMP-DH isoform II is mainly expressed in lymphocytes (both T and B) and its inhibition interfere with DNA synthesis impairing the function of immune system cells.

Methods. We developed an high-performance-capillary-electrophoresis (HPCE) method with UV detection for MPA analysis, which does not involve drug derivatization. The analysis were carried out in an uncoated fused capillary 50cm X 50 µm i.d. Borate buffer (30 mmol/L) containing sodium dodecyl-sulfate (SDS, 10 mmol/L) was used. Conditions were pH 9.20, 18 kV and 3 psi*sec hydrodynamic load, at 25°C. The electric field was 300.00 V/cm with a current of approximately 75 µA. Electro-osmotic flow velocity was 0.131 cm/sec (calculated using methanol as neutral marker, and the results were read over the range 190-300 nm and analysed at 214 nm. Between runs, the capillary was washed with 0.1 mol/L NaOH for 30 sec, running buffer for 60 sec.

Results and Conclusions. The technique enables optimum evaluation of MPA in plasma samples, after deproteinization with acetonyltryl with a good resolution from other compounds present in the sample matrix. We cross validate our method with respect to HPLC, pointing out a very good accuracy with comparable precision and sensitivity, with the advantage of a fast and unexpensive procedure. Capillary electrophoresis for MPA dosage seems, therefore, to satisfy criteria for application to therapeutic drug monitoring and related pharmacokinetic studies.

References. Cattaneo D. et al. Pharmacokinetics help optimizing mycophenolate mofetil dosing in kidney transplant patients. Clin Transplant. 15:402,2001.

116

MONITORING OF IRINOTECAN ANTICANCER DRUG PHARMACOKINETICS IN HIV PATIENTS WITH KAPOSI'S SARCOMA DURING COADMINISTRATION OF LOPINAVIR/RITONAVIR ANTIRETROVIRAL DRUGS

G. Corona¹, E. Vaccher², S. Sandron¹, I. Sartor², U. Tirelli², G. Toffoli¹

¹Experimental and Clinical pharmacology Unit, National Cancer Institute CRO-IRCCS, Aviano (PN), Italy

²Division of Medical Oncology A, National Cancer Institute CRO-IRCCS, Aviano (PN), Italy

Purpose. It is retained that the unpredictable and unacceptable side effect observed in the use of anticancer agents in the treatment of patients with HIV related malignancies could be due to the pharmacokinetics (PK) interactions between anticancer agents and drugs components of the high active antiretroviral therapy. The aim of this study is to evaluate the changes in the PK profile of the anticancer irinotecan (CPT11) occurring during the coadministration of the antiretroviral Lopinavir boosted with ritonavir (Kaletra®:LPV/rvt).

Methods. Six HIV patients with Kaposi's sarcoma are treated with CPT11 at a dose of 150 mg/m², given as a 90-min infusion in absence and in combination of 400mg/100mg LPV/rvt. Plasma drug concentrations of CPT11, SN38, SN-38Gluconide and the APC metabolites were determined by a validated HPLC method and fluorimetric detection. PK of CPT11 alone was performed at day 1 whereas the PK of CPT11 + LPV/rvt was determined after 10 day of the chemotherapy cycle. The PK parameters for CPT11 and metabolites were determined by the non-compartmental model.

Results. Plasma concentrations of CPT11 were found significantly increased during the course of CPT11+ LPV/rvt as compared to CPT11 alone. The CPT11 clearance was significant lower 13.39 3.39 l/h/m² and 23.55 7.16 l/h/m², p < 0.05 for CPT11+ LPV/rvt and CPT11 alone respectively. LPV/rvt inhibits (> 90%) the production of the oxidized APC while increases the area under curve of SN38 and SN38G of about 2.9 and 1.8 fold respectively. During the CPT11+ LPV/rvt the ratio SN38/CPT11 was higher (0.031 0.008 vs 0.019 0.006 p<0.05) while the glucuronidation ratio (SN38G/SN38) was found significant lower (5.50 1.43 vs 9.03 2.49, p<0.05) as compared to CPT11 alone.

Conclusions. This study points out that the LPV/rvt strongly increases plasma concentrations of CPT11 and its active metabolite to a potential hazard level. This seems to be consequent to the reduction of CPT11 clearance and the SN38 glucuronidation paths. CPT11 dose adaptation guided by the monitoring of CPT11 and metabolites appears strongly suggested in HIV patients during concomitant antiretroviral and anticancer treatment to optimize pharmacodynamic of CPT11.

117

DETERMINATION OF L-ALPHA AMINOADIPIC ACID LEVELS IN HUMAN AND EXPERIMENTAL EPILEPSY

G. A. Deiana¹, D. Corda¹, M. Barrocu¹, M. G. Piluzza¹, G. Zucca¹, G. Sechi¹

¹Lab. di Neurochimica, Ist. di Clinica Neurologica, Università di Sassari, Sassari

L- α -aminoadipic acid (AAA), a six-carbon homologue of glutamate, is derived from lysine and it is a natural metabolite of brain. This compound is known to have gliotoxic action at micromolar doses and hence neurotoxic effects on different regions of the brain. We studied the levels of AAA and other several free aminoacids (glutamate, aspartate, taurine, serine, phosphoserine, glycine) in serum, CSF, and interstitial fluid (IF) of the brain in adult dogs rendered epileptic till development of convulsive tonic-clonic generalized status, by administering pentylenetetrazole (PTZ) I.V., at 300-400 mg/kg, after anesthesia with thiopental sodium (group A). The same determinations were made in a group of dogs anesthetized only (group B). In blood, CSF and brain IF samples were taken at 5/10/30/60 min. after the appearance of seizures. Two-three dogs were used at each time. AAA levels were also determined in serum and CSF of 10 healthy individuals. Free aminoacids were analyzed by System Gold HPLC Beckman: after precipitation of protein with sulfosalicylic acid, aminoacids were separated with a cation-exchange resin column under acidic conditions, increasing the pH of the buffer eluent. The concentration of each aminoacid was measured by reaction of the aminoacid with ninhydrin and detection of the colored product with a colorimeter (500 nm).

AAA was not detectable either in serum, or in CSF of healthy individuals. In dogs of group A, a dramatic increase of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate was observed in the first 10 min. of seizures. Moreover, at 5/10/30/60 min., AAA was recovered in moderate amount in epileptic brain IF ($18 \pm 4 \mu\text{mol/l}$). In brain IF of group B, instead, this compounds was not detectable or was present in minimal amount. AAA may enhance dramatically the neurotoxicity of glutamate, thus it might play a role in PTZ-seizure related brain damage. Moreover, our data indicate the opportunity to investigate the brain IF content of AAA in other experimental models of epilepsy, cerebral ischemia and in human diseases.

Reference. Sechi GP, Rosati G, Deiana GA et al. Co-variation of free amino acids in brain interstitial fluid during pentylenetetrazole-induced convulsive status epilepticus. *Brain Research* 764:230-6,1997.

118

DOSAGGIO DEL METABOLITA DELLA OXCARBAZEPINA IN RELAZIONE ALLE MODIFICAZIONI DELL'ECCITABILITA' CORTICALE

G. B. Faccini¹, C. Cacciatori², L. G. Bongiovanni², M. G. Bonetto¹, C. Gerani¹, A. Fiaschi², P. Manganotti², G. Guidi¹

¹Dip. Sc. Morfologico Biomediche, Lab. Analisi Chim. Clin. ed Emat., Policlin., Università di Verona

²Dip. Sc. Neurologiche e della Visione, Policlin., Università di Verona

Scopo. La oxcarbazepina (OXC) viene somministrata per il trattamento del dolore neuropatico. In tale ambito abbiamo studiato la correlazione tra i livelli ematici della 10-idrossi-carbazepina (M-OXA, metabolita attivo della oxcarbazepina) e l'eccitabilità motoria per mezzo di diversi parametri di stimolazione magnetica transcraniale (TMS) in pazienti con dolore neuropatico tra i quali le soglie motorie a riposo (rMT) e durante attivazione (aMT).

Materiali e Metodi. Il siero, deproteinizzato, viene analizzato mediante tecnica cromatografica HPLC impiegando una colonna a fase inversa. Viene poi quantificato servendosi di un rivelatore UV/VIS a 204 nm e dello standard interno.

Soggetti. Sette pazienti (3 maschi e 4 femmine), di età media 66.2 anni (range 52-83), con dolori neuropatici agli arti furono trattati inizialmente con un'unica dose pari a 300 mg di OXC nella prima settimana, aumentati a 600 mg nella seconda, a 900 mg nella terza ed infine a 1.200 mg quale dose di mantenimento.

Risultati. I livelli di M-OXA furono monitorati per 5 sessioni: prima dell'assunzione di OXC (livello basale) e dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di trattamento ottenendo rispettivamente i seguenti valori medi (micromoli/L): 0, 16.28, 43.46, 74.51 e 102.98. In concomitanza a ciò si è osservato un aumento continuo della soglia d'eccitabilità a riposo, rTSM, sino al raggiungimento dello stato stazionario della M-OXA. I corrispondenti valori (espressi come % di rTM) sono: 59, 60.2, 61.7, 61.9, 63.2.

Conclusioni. Questo studio dimostra che nei pazienti trattati con OXC vi è un aumento della soglia rMT a livelli ematici crescenti di M-OXA, suggerendo una relazione tra il metabolismo del farmaco e l'eccitabilità corticale studiata mediante stimolazione magnetica transcranica dell'area motoria.

Bibliografia. Ziemann U, Lonnecker S, Steinhoff BJ, Paulus W. Effects of antiepileptic drugs on motor cortex excitability in humans: a transcranial magnetic stimulation study. *Ann Neurol* 1996;40:367-78.

119

DOSAGGIO SOSTANZE D'ABUSO E INCIDENTI STRADALI

M. Filocamo¹, M. Tura¹, C. Arlotti¹, D. Casali¹, F. Peruzzi¹, B. Semprini¹, M. Arcangeli¹, S. Szymczuk¹, J. Bassani¹, G. B. Volpones¹

¹Medicina di laboratorio Ospedale Infermi, Rimini

L'assunzione di sostanze stupefacenti da parte di conducenti di veicoli comporta un aumento cospicuo del rischio di incidente stradale; tali sostanze infatti incidono sulla capacità di guida attraverso modificazione dei riflessi, della concentrazione, dell'umore, della capacità di autocontrollo. Obiettivo di questo lavoro è valutare la percentuale di positività delle richieste di dosaggio di sostanze d'abuso su conducenti coinvolti in incidenti stradali e le sostanze più frequentemente utilizzate.

A tal fine sono valutate le richieste pervenute al nostro laboratorio negli anni 2000-2005. Le sostanze ricercate su matrice urinaria sono Amfetamine/Metamfetamine, Cocaina, T.H.C., Oppiacei, Metadone, Benzodiazepine e LSD.

Il nostro protocollo prevede la raccolta del campione urinario a vista, suddiviso in due aliquote sigillate e firmate dall'operatore addetto alla raccolta e dal paziente e inviate alla nostra sezione garantendo il protocollo "catena di custodia". Sono pervenute, durante il suddetto periodo, 356 richieste. Su tutti i campioni è stato eseguito il test di screening con metodo immunochimico su strumentazione automatica (Dimension arx - Dade Behring e Cobas Mira-Roche) e i campioni risultati positivi sono stati confermati mediante tecnica HPLC multicolonna automatizzata (REMEDI-Biorad), HPLC Agilent o con tecnica GC-MS.

Su 356 richieste, 192 (pari al 54%) sono risultate positive ad una o più sostanze, con un minimo (46.6%) nell'anno 2004 e un massimo (64%) nel 2000.

Tra le sostanze prevale la cannabis (150 campioni positivi), seguita dalla cocaina (115), dall'ecstasy (71 campioni positivi per ecstasy e/o amfetamina) e dagli oppiacei (58 campioni che evidenziano la presenza di morfina al successivo test di conferma). La poliassunzione è un fenomeno in progressivo aumento; nel nostro studio l'utilizzo combinato di più sostanze riguarda soprattutto i cannabinoidi e la cocaina.

Nella nostra casistica, che non si discosta dai dati nazionali, le sostanze stupefacenti rappresentano fattori importanti nella genesi degli incidenti stradali.

Bibliografia. Stragi del sabato sera: esperienza di Rimini. Filocamo M., Tura M., Arlotti C., Casali D., Peruzzi F., Arcangeli M et al. *Biochimica Clinica* vol 28, n. 1, 2004

120

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT): STABILITA' DEL CAMPIONE NEL TEMPO

M. Filocamo¹, M. Tura¹, C. Arlotti¹, D. Casali¹, F. Peruzzi¹, B. Semprini¹, M. Arcangeli¹, S. Szymczuk¹, J. Bassani¹, G. Volpones¹

¹Medicina di Laboratorio, Ospedale Infermi, Rimini

L'infrazione dell'art.186 del C.d.S. "Guida sotto l'effetto dell'alcool" comporta ritiro immediato della patente di guida e successiva verifica di idoneità da parte della Commissione Medico Locale (CML). Il protocollo per valutare l'intossicazione cronica di alcool, utilizzato dalla CML della provincia di Rimini, prevede una serie di marcatori biochimici quali: MCV, γ GT, AST e ALT, CDT. La richiesta della CDT ha pertanto valenza medico legale e conservare una aliquota del campione è utile in caso di revisione di analisi. Obiettivo di questo studio è valutare la stabilità della CDT a distanza nel tempo. I campioni ematici, una volta processati, vengono stoccati a -20°C. Successivamente, a distanza nel tempo (3 e 6 mesi), vengono scongelati a temperatura ambiente, risospesi e rianalizzati con lo stesso metodo. Sono stati analizzati 60 campioni di siero con valori di CDT positivi (>2.6% al test immunochimico e >2.0% al test HPLC), suddivisi in due gruppi: gruppo A rianalizzati dopo tre mesi dal prelievo e gruppo B rianalizzati dopo sei mesi. Per entrambi la misura della CDT è stata eseguita con i metodi % CDT-TIA Standard e % CDT by HPLC, ambedue della ditta BIORAD. Il primo è un test immunochimico eterogeneo con separazione in colonna seguita dalla misurazione turbidimetrica della quantità di CDT in proporzione alla transferrina totale; nel secondo le isoforme della transferrina vengono separate su un sistema HPLC su colonne a scambio anionico, con rivelazione per assorbimento UV a 460 nm, su sistema Agilent 1100. I risultati da noi ottenuti indicano una soddisfacente ripetibilità: la media del coefficiente di variazione per il gruppo A è del 7.66% per il metodo immunochimico e del 2.18% per il test HPLC; per il gruppo B è rispettivamente del 7.61% e 2.94%. A nostro parere la differenza di coefficiente di variazione tra i due metodi non è dovuta alla conservazione del campione bensì alla differente metodologia, più accurata e precisa per il metodo HPLC. Dall'analisi dei nostri dati si evince che è possibile conservare il campione almeno per sei mesi dal prelievo.

Bibliografia. Validazione di una metodologia di lavoro per la determinazione della transferrina carboidrato carente. Casali D., Filocamo M. e al. *Biochimica Clinica* vol 29 n. 2,2005

121

NUOVO METODO FLUORIMETRICO PER IL MONITORAGGIO DI RADICALI IDROSSILICI IN VIVOW. Freinbichler¹, M. A. Colivicchi¹, C. Ballini¹, M. Fattori¹, L. Bianchi³, W. Linert², L. Della Corte¹¹Dip. Farmacologia Preclinica e Clinica, Firenze²University of Technology, Vienna³Osp. Ss Cosma e Damiano, Pistoia

I radicali ossigeno-reattivi giocano un ruolo cruciale in molte malattie neurodegenerative e nel danno cerebrale da ischemia o arresto cardiaco. Il metodo dell'idrossilazione dell'acido salicilico (AS) disponibile per monitorare radicali idrossilici (OH) presenta notevoli inconvenienti: 1) monitoraggio di uno solo dei tre derivati; 2) rapporto tra i derivati dipendente dal tempo di incubazione; 3) AS, di per sé biologicamente attivo, che può influenzare la formazione di radicali.

Obiettivo. Scopo dello studio era sviluppare un metodo affidabile per la determinazione degli OH in vivo, in esperimenti di microdialisi nello striato (STR) di ratto, simultaneamente alla determinazione degli aminoacidi (aa): aspartato (ASP), glutammato (GLU), taurina (TAU) e GABA (1).

Metodo. Nel metodo si utilizza il sodio tereftalato (NaTA) che interagisce selettivamente con gli OH formando un unico prodotto fluoroforo stabile, 2-idrossi-tereftalato (OH-TA) e un sistema HPLC con rivelazione fluorimetrica. I campioni sono dialisati ottenuti dalla perfusione (2 μ l/min per 20 min) dello STR con aCSF (liquido cerebro spinale artificiale) e aggiunta di NaTA 250 μ M prima, durante e dopo applicazione intraSTR di KA 250, 500, 1000 μ M. In vitro, nel range di concentrazione di NaTA 5-500 nM (Ditta Fluka), il coefficiente di regressione lineare è maggiore di 0,99 e il CV < 10%. Nei dialisati (10 μ l) OPA-derivatizzati, OH-TA (λ eccitazione 315 ed emissione 435 nm) eluisce a 2,57 min, mentre ASP, GLU, TAU e GABA (λ 340, e 455 nm) eluiscono a 5,08, 7,71, 10,28 e 11,49 min rispettivamente. Le concentrazioni di OH-TA nel dialisato vengono estrapolate da curve standard (in aCSF + NaTA 250 μ M) con OH-TA (fornito da Linert W., purezza >99%). La formazione di OH-TA, KA-indotta, è dose-dipendente.

Conclusioni. Questo nuovo metodo, che permette il monitoraggio simultaneo in vivo di OH e di neurotrasmettitori eccitatori e inibitori rappresenta un valido strumento per studi di neuroprotezione in modelli animali in condizioni neurodegenerative.

Bibliografia. Bianchi L., Della Corte L. & Tipton K.F. (1999). Simultaneous determination of basal and evoked output levels of aspartate, glutamate, taurine and 4-aminobutyric acid during microdialysis and from superfused brain slices. *J. Chromatogr. B*, 723, 47-59.

122

ALCOL NEI PAZIENTI DEL PRONTO SOCCORSOA. Frezzotti¹, M. D. Solenghi¹, M. d'Anzeo¹, S. Polonara², M. Tocchini¹¹Lab. Analisi Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I, Lancisi, Salesi, Ancona²Pronto Soccorso Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I, Lancisi, Salesi, Ancona

Scopo. Il presente studio, condotto sui pazienti del Pronto Soccorso (PS), valuta l'andamento delle richieste di determinazione di alcol nel sangue, BAC (blood alcohol concentration), e dei risultati di BAC per individuare la popolazione e le situazioni da tenere sotto controllo e per le quali sono auspicabili interventi di prevenzione.

Materiali e Metodi. Ogni anno il PS richiede al laboratorio circa 25.000 BAC. Nel periodo 2000-2005 sono state eseguiti 336, 426, 494, 822, 966 e 1114 determinazioni di BAC/anno. Valori di BAC > 0,5g/l sono stati considerati indicativi di intossicazione acuta da alcol. Il confronto tra i valori di BAC negli anni e tra maschi e femmine (M, F) è stata effettuato con il test t Student; la frequenza dei soggetti intossicati nelle diverse ore del giorno e negli anni è stata valutata con il test CHI².

Risultati. I valori di BAC > 0,5g/l sono stati: 230 (68%) nel 2000, 308 (72%) nel 2001, 336 (68%) nel 2002, 417 (50%) nel 2003, 447 (46%) nel 2004 e 468 (42%) nel 2005; l'età media dei M, 39 anni, non differisce significativamente dalla età media delle F, 41 anni, e il 30% sia dei M che delle F aveva meno di 30 anni. I valori medi di BAC, 202g/l nei M e 205g/l nelle F non sono significativamente diversi (p=0,15). Il 58% degli esami per BAC sono stati richiesti nelle ore 22-6; in queste ore si è osservato il più elevato valore predittivo per BAC > 0,5g/l con un odds ratio di 3,1 (CHI²=345,22 e p<0,0001) e il 50% sia dei M che delle F aveva meno di 30 anni. Il confronto tra numero di BAC > 0,5g/l e BAC < 0,5g/l nel periodo 2003-2005 vs 2000-2002 è statisticamente significativo (CHI²=181,66, p<0,0001).

Conclusioni. L'aumento negli anni di esami per BAC evidenzia una maggiore attenzione al controllo dell'abuso di alcol e l'aumento di BAC > 0,5g/l indica l'alcol come causa crescente per la richiesta di cure al PS. I dati evidenziano nei pazienti più giovani la popolazione più a rischio a cui rivolgere interventi educativi-preventivi e le ore notturne il periodo del giorno in cui attuare azioni di maggior controllo.

Bibliografia. Young DJ et al. Emergency room injury presentations as an indicator of alcohol-related problems in the community: a multilevel analysis of an international study *J Stud Alcohol* 2004;605-12.

123

BENZODIAZEPINE: CONFRONTO FRA METODO IMMUNOENZIMATICO E CROMATOGRAFICO

D. Furlani¹, A. Mussa¹, A. Caropreso¹

¹Laboratorio Chimica Analitica ASO S. Giovanni Battista di Torino

Scopi e Obiettivi. Verificare l'efficacia di un metodo immunoenzimatico per accertare la presenza di molecole benzodiazepiniche nel siero mediante confronto con i risultati ottenuti con un metodo cromatografico.

Metodologia. n= 38 sieri di pazienti con sospetta intossicazione da lormetazepam, flurazepam e delorazepam, midazolam, lorazepam, bromazepam, diazepam o da altre molecole benzodiazepiniche sono stati analizzati con metodo immunoenzimatico semiquantitativo Dade Behring (calibratore diazepam) e con metodo cromatografico Chromsystems (calibratore multiparametrico commerciale titolato per clordiazepossido, bromazepam, oxazepam, nitrazepam, alprazolam, clonazepam, flunitrazepam, nordiazepam, clobazam, diazepam, flurazepam,lorazepam e delorazepam). I campioni sono stati suddivisi in tre gruppi relativamente ai risultati ottenuti con il test immunoenzimatico:

a)risultati < 70 ng/ml (sensibilità del metodo dichiarata) n=16

b)risultati > 70 e<300 ng/ml (cut off di positività dichiarata) n=6

c)risultati > 300 e< 2000 ng/ml (linearità dichiarata) n=16
Risultati. a) nel 66% dei casi il test HPLC di campioni con risultato <70 ng/ml non evidenzia molecole benzodiazepiniche. Il 34% evidenzia livelli terapeutici per bromazepam, nordiazepam, e subterapeutici per clobazam, norclobazam.

b) nel 50% dei casi l'analisi cromatografica quantizza livelli terapeutici di nordiazepam e bromazepam; nel restante 50% i livelli di bromazepam sono superiori alla sua soglia di tossicità di 300 ng/ml.

c) nel 50% dei casi si è evidenziata una sottostima del nordiazepam quale metabolita, a concentrazioni tossiche > 2000 ng/ml, del lormetazepam; nel 12% dei casi il test cromatografico ha evidenziato una sovrastima di livelli terapeutici di delorazepam; nel 12% dei casi una sottostima di livelli terapeutici di clobazam e norclobazam. Nel 26% dei casi i risultati ottenuti con il metodo immunoenzimatico correlano con i risultati del test HPLC relativamente alla molecola di diazepam in concentrazioni inferiori a 2000 ng/ml.

Conclusioni. Se i dati preliminari fin qui rilevati saranno confermati, verrà valutata la possibilità di utilizzo del metodo cromatografico già in fase di screening.

124

A CASE OF OLEANDRIN POISONING THROUGH ALIMENTARY CHAIN

C. Gechtman¹, A. Masarin¹, F. Zoppi¹, G. Eleftheriou², G. Bacis², M. L. Farina², D. Mori³, F. Guidugli⁴

¹Dip. Medicina di Laboratorio, Osp. Niguarda Cà Granda, Milano

²CAV, Ospedali Riuniti, Bergamo

³Dip. Medicina, Osp. Treviglio e Caravaggio

⁴Thermo Electron Corporation, Rodano Milano, Italy

Case Report. Two persons (a female and male) showed gastrointestinal and cardiovascular symptoms after they ate an escargot (snail of the species *Helix pomatia*) stew. They were hospitalized 12 h after the ingestion with cardiovascular symptoms similar to those observed after acute toxic digoxin. They presented nausea, vomiting and diarrhea; the man's ECG was altered, while the woman's one was normal.

Materials and Methods. Digoxin was measured in the different matrices on a COBAS Integra 800 automated biochemistry analyzer, with COBAS Integra Digoxin (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The cross-reactivity vs. oleandrin has been characterized by Jortani et al. A Finnigan LXQ instrument (ESI interface). coupled with a Surveyor MS pump and autosampler (Thermo Electron Corporation), equipped with a Waters XTerra C18 column (4.6 × 250 mm, 5 μ) was used. A gradient of methanol/water (methanol, 10% at T0 to 95% at 10 min, then isocratic to 15 min; down to 10% at 17 min) was pumped at a flow rate of 1000 μL/min.

Results. At admission, measured serum digoxin levels were 1.14 nmol/L, (man) and 1.00 nmol/L (woman) - Laboratory therapeutic range 0.64 ÷ 2.56 nmol/L-. On the second day the serum digoxin concentration decreased and no further therapy was performed. The symptoms resolved on the third day and the patients fully recovered with reversion to a normal sinus rhythm on the third day. Cardiac-glycoside-like intoxication following ingestion of *Digitalis purpurea* is a common clinical problem. But the same symptoms are present if leaves or flowers of *Nerium oleander* are ingested. through accidental ingestion or/and intentional administration. The suspect arose that the eaten snails were responsible of the intoxication. In the snail homogenized tissue the concentration expressed, as above, in digoxin equivalents was 0.282 nmol/g. The presence of oleandrin and oleandrogenin in the snails was confirmed by LC-MS/MS analysis.

Conclusions. As far as we know, this is the first reported case concerning an indirect cardiac glycosides intoxication, involving food, poisoned through alimentary chain.

Reference. Jortani SA, Helm RA, Valdes R, Jr. Inhibition of Na, K-ATPase by oleandrin and oleandrogenin, and their detection by digoxin immunoassays. *Clin Chem* 1996;42:1654-58.

125

DETERMINATION OF EPHEDRINE, MDMA AND "SMART AMPHETAMINES" IN URINE FROM VOLUNTEERS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

E. Marchei¹, S. Pichini¹, I. Palmi¹, R. Pacifici¹, M. Pujadas², R. De La Torre², P. Zuccaro¹

¹Department of Drug Research and Evaluation, Italian National Institute of Health, Rome, Italy

²Pharmacology Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain

At moment, the recreational consumption of 3, 4 methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and ephedrine is frequently combined with the use of new psychoactive amphetamine-like compounds (4-OH-DIPT, 4-AC-DIPT, 2CD, 2CB, 2CBfly, 2CT2, 2CI, 2CE and m-CPP).

We report a simple liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analytical method for the identification and quantification of these substances in urine of consumers. One enzymatically-hydrolyzed and one non hydrolyzed mL urine was extracted by Bond-Elut Certify solid phase extraction columns with a standardized methodology. Chromatographic separation was achieved at ambient temperature using a reverse phase column and a mobile phase of 80% ammonium carbonate – 20% acetonitrile with a 20 min gradient program. The mass spectrometer was operated in positive electrospray ionization (ESI) and selected ion monitoring (SIM) acquisition mode. The following conditions were applied: drying gas (nitrogen) heated at 350°C at a flow rate of 12.0 L/min; nebulizer gas (nitrogen) at a pressure of 50 psi; capillary voltage at 4000 V; fragmentor voltages at 110 V for ephedrine, MDMA, 2CD, 2CT2, 2CBfly and 2CI; 150 V for 2CE and 2CB and 200 V for m-CPP, 4-OH-DIPT and 4-AC-DIPT.

The method was validated in the range 5-1000 ng/ml for all the analytes. Mean analytical recovery ranged between 60.4% and 90.5%. The method is applied to urine samples collected from volunteers which recreationally consumed one of more of these compounds. All analytes were in the range of hundreds ng/mL and their content in the hydrolyzed samples was around two-fold the one in non hydrolyzed urine.

The assay is simple and proved to be sensitive enough for the determination of these new compounds of interest in urine.

Reference. Maurer HH, Kraemer T, Springer D, Staack RF. Chemistry, pharmacology, toxicology, and hepatic metabolism of designer drugs of the amphetamine (ecstasy), piperazine, and pyrrolidinophenone types: synopsis. *Ther Drug Monit.* 2004;26:127-31.

126

A SIMPLE CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE ANALYSIS OF LAMOTRIGINE IN SERUM

A. Martini¹, G. Di Ruvo¹, L. Filippini¹

¹Clinical Biochemistry Laboratory, AO Ospedale Civile di Legnano, Legnano (MI)

Background. Lamotrigine (Lamictal) is an antiepileptic drug used in association with valproate or carbamazepine in the treatment of resistant epilepsy. The efficacy of the therapy is also established with the aim of serum levels (1).

In this work we presented a simple method that involves LLE extraction, RP-HPLC and detection of the drug in UV region.

Materials and Methods. Stock solution of the drug and I.S. (Butalbital) was made in methanol (0.1 g/L). The control materials (level 1, 2 and 3) was purchased from Biorad. The column for separation was a Supelcosil LC-18DB (150x4,6 mm., 5 µm). The working standard solutions for Lamotrigine was obtained by diluting stock solution with drug-free plasma to a final concentration of 1.25 – 2,5 – 5.0 – 10.0 and 20.0 mg/L. Briefly, the method was the follow: 200 µL of sample was added to 500 µL of a mixture isopropanol/AcOEt (2:8 v/v) and saturated with NaCl. After vigorous mixing for 30 s and centrifugation a 3000 g, 50 µL of the supernate was directly inject into chromatograph. Separation was achieved under isocratic condition using a mobile phase consisting of 0.01M KH₂PO₄ (pH 5.0)/acetonitrile 62:38 at flow rate of 1.2 mL/min, monitoring the effluent at 310 nm. Quantitation was made by measurement of the peak area ratio of the drug to the I.S. The linear regression equation was y(concentration)= 1,14 (peak area) – 0.03, in the range 1.25 - 20.0 ng/mL. At concentration of 9.1 mg/L and 3.2 mg/L the within run C.V. was 3.3% and 5.8% (n= 5) respectively while the between run C.V. was 3.8% and 6.7% (n=5). To test interferences from the other commonly administrated antiepileptics, drug-free plasma was spiked with lamotrigine and a lot of drugs to obtain a serum concentration ranged from 10 mg/L to 50 mg/L. No peaks overlapping to the peak of lamotrigine was observed.

Conclusions. The separation and quantitation of lamotrigine with present method is very easy to perform and absolutely free from interferences from commonly administrated anticonvulsants.

Reference. E. Perucca, *Fund. Clin. Pharm.*, 15 (2001) 405.

127

DETERMINAZIONE DELLA MORFINA E DELLA CODEINA IN HPLC

C. Martini¹, G. Coppa¹, A. M. Margarucci Gambini¹, P. Pignini¹, M. Tocchini¹

¹Laboratorio Analisi, Ospedali Riuniti, Ancona

Risultati di screening sulle urine, positivi alla morfina (MOR), possono essere dovuti sia all'assunzione di eroina, che all'assunzione di farmaci codeinici utilizzati nelle terapie del dolore.

L'eroina viene rapidamente metabolizzata a 6-monoacetilmorfina e nello step successivo, si ha l'idrolisi a morfina; la codeina (COD) invece viene direttamente trasformata in morfina. La morfina si rileva nelle urine per la maggior parte nella forma glucuronata, minime quantità di codeina, sono rintracciabili anche sulle urine di pazienti che assumono eroina.

Il metodo utilizzato prevede un'estrazione SPE su colonne Bond Elut Certify 130mg/1ml, previa idrolisi enzimatica del campione di urina con β -glucuronidasi.

L'analisi avviene in HPLC in fase inversa, utilizzando una colonna CN 5 μ 4.6x250mm, la fase mobile è costituita da KH₂PO₄ 25mM/CH₃OH (75:25) a pH 5.6 e il flusso applicato è 1 ml/min. L'eluato è monitorato mediante un detector fluorescenza a una lunghezza d'onda di eccitazione di 215nm e di emissione di 345nm.

Si stabilisce l'identità di ciascun analita per confronto dei tempi di ritenzione (MOR=5.5 min, COD=8.1 min), dopo iniezione degli standard trattati come i campioni di urina, su una corsa cromatografica di 15 min.

La valutazione quantitativa si effettua attraverso una retta di regressione, costruita correlando le altezze dei picchi degli standard con le rispettive concentrazioni.

Gli standard, preparati a partire da morfina cloridrata e da codeina fosfato, presentano per MOR concentrazioni pari a 150-600-3000 ng/ml ($R^2=99.99\%$), per COD concentrazioni di 100-500-1500 ng/ml ($R^2=99.99\%$). Il metodo ha un recupero per la morfina del 76.6%, per la codeina dell'80.3%. La minima concentrazione rilevabile sui campioni è per MOR 35 ng/ml per COD 20 ng/ml.

Il metodo messo a punto soddisfa i criteri di semplicità operativa, riproducibilità, sensibilità e specificità richiesti per le determinazioni analitiche di interesse clinico-tossicologico. La determinazione simultanea di codeina e morfina permette di discriminare campioni positivi per assunzione di eroina, da quelli positivi per terapia con farmaci contenenti codeina, in quest'ultimi infatti la presenza di morfina è minima e prevale la concentrazione di codeina.

128

DOSAGGIO DELLA VANCOMICINA: METODI A CONFRONTO

M. Miatton¹, F. Sirianni¹, C. Lazzi¹, B. Della Vedova¹, M. Baraldo², A. Francesconi²

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche ASS n°5 "Bassa Friulana" Osp. di Palmanova

²Istituto di Farmacologia Università Udine

Introduzione. La vancomicina è un antibiotico che possiede uno spettro d'azione verso batteri Gram +, compresi i ceppi di Stafilococchi beta lattamasi produttori e meticillino-resistenti. In ambito ospedaliero la vancomicina è la terapia di prima scelta nei confronti delle infezioni sostenute da Stafilococco aureo.

Scopo del Lavoro. Valutare precisione e stabilità di un recente metodo immunoturbidimetrico e confrontare i risultati ottenuti con metodo FPIA.

Materiali e Metodi. Sono stati testati 83 campioni di pazienti di diversi reparti trattati con vancomicina (età da 32 a 84) e afferenti al laboratorio di Farmacologia dell'Università di Udine. I prelievi sono stati raccolti in K2EDTA e centrifugati a 3000 rpm. I plasmi venivano testati con TDX (FPIA) e dopo con ADVIA 1650 (metodo immunoturbidimetrico) o congelati a -20° C fino al momento del dosaggio.

Risultati. E' stata valutata la precisione nella serie e tra le serie testando tre controlli a titolo noto su ADVIA

Precisione intraserie (n = 10) Precisione interserie (n = 16)

Media ds CV % Media ds CV%

Controllo 1 11.38 0.158 1.39 11.30 0.536 4.75

Controllo 2 37.68 0.204 0.54 37.05 0.739 1.99

Controllo 3 65.97 1.340 2.03 67.48 1.182 1.75

Il confronto tra i risultati è stato valutato nel range compreso tra 0.62 e 38.09 μ g/mL. Equazione risultante: ADVIA 1650 = 1.061 TDX + 0.605, con r = 0.982.

Discussione e Conclusioni. L'imprecisione nella e tra le serie confermano i dati dichiarati dalla ditta produttrice. Lo strumento ADVIA 1650 fornisce un risultato in tempi brevi con una buona correlazione rispetto al metodo FPIA. Poter disporre di tale dosaggio utilizzando uno strumento per la chimica clinica di routine, attivo 24 ore su 24 e di semplice utilizzo può essere di notevole aiuto nel monitoraggio di pazienti critici evitando di trasferire i campioni in centri specializzati.

129

BUPRENORFINA: CONFRONTO TRA METODICHEA. Palla¹, C. Falciani¹, M. Giordano¹, R. Gorini¹, N. Simonini¹, A. La Gioia¹¹Lab. Analisi Chimico-Cliniche, Azienda USL 6, Livorno

La buprenorfina (BU), oppiaceo semi-sintetico derivato della tebaina e agonista parziale dei recettori μ degli oppiacei, è una molecola ad azione analgesica somministrata ad elevate dosi (Subutex) nel trattamento sostitutivo delle tossicodipendenze da eroina. Tra le varie tecniche analitiche in grado di determinare la BU nelle matrici biologiche, quelle immunochimiche sono le più impiegate nello screening su urine al fine di verificare la compliance dei pazienti trattati. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a confronto i risultati ottenuti con le metodiche di due tecniche immunochimiche: EIA (Enzyme Immuno Assay) e CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immuno Assay). Sono stati analizzati 318 campioni urinari provenienti principalmente dal SerT (nell'ambito dei programmi di riabilitazione e cura di tossicodipendenti) e, per il resto, dalla Medicina Legale (per accertamenti diagnostici di natura legale). Le determinazioni analitiche sono state eseguite impiegando in successione: a) metodica EIA manuale della Ditta Cozart con kit EIA Buprenorphine urine; cut-off: 1,0 ng/mL b) metodica CEDIA della Ditta Microgenics su analizzatore ILab600 (Instrumentation Laboratories) con kit CEDIA Buprenorphine Assa; cut-off: 5,0 ng/mL. Sono stati evidenziati 8 coppie di risultati discordanti (pari al 2,5% del totale), più precisamente 7 POSITIVI in EIA e NEGATIVI in CEDIA, 1 NEGATIVO in EIA e POSITIVO in CEDIA. Dal confronto tra le due metodiche sono emerse differenze riguardanti soprattutto la tipologia degli anticorpi anti-BU impiegati e la presenza o meno di cross-reattività per la nor-buprenorfina (metabolita della BU). Concludendo, il numero maggiore di risultati positivi ottenuti con la tecnica EIA potrebbe essere attribuito ad una minore specificità del dosaggio (anticorpi policlonali) e/o alla maggiore capacità di evidenziare la presenza della norbuprenorfina da parte di questa metodica. Tuttavia le criticità del test (evidenziate anche dai risultati ottenuti nel programma di VEQ) rendono necessari ulteriori approfondimenti al fine di ottenere una uniformità di risposta diagnostica.

Bibliografia. F. Vincent, J.Bessard, et al. "Determ. of Buprenorph. and Norbuprenorph. in urine and hair by Gas Chromatography-Mass Spectrometry". J. Anal. Tox. 1999;23:270-279.

130

DETERMINATION OF SYNEPHRINE IN DIETARY SUPPLEMENTS BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRYI. Palmi¹, R. Di Giovannandrea¹, E. Marchei¹, M. Pellegrini¹, S. Pichini¹, P. Zuccaro¹, R. Pacifici¹¹Department of Drug Research and Evaluation, Italian National Institute of Health, Rome, Italy

Citrus aurantium is a plant belonging to the Rutaceae family. The active constituents of its fruits are flavonoids and adrenergic amines (synephrine, octopamine and tyramine) structurally related to endogenous neurotransmitters (epinephrine and norepinephrine) and ephedrine. Synephrine, the most abundant active component, produces effects on human metabolism which could be useful for reducing fat mass in obese human since it stimulates lipolysis, rises metabolic rate and oxidation of fat through increased thermogenesis. In fact, weight loss dietary supplements containing Citrus aurantium extract have rapidly replaced products containing ephedrine alkaloids, which are now banned from sale. However, similarly to ephedrine alkaloids, synephrine can produce adverse effects the cardiovascular system, due to adrenergic stimulation effects. A simple and rapid procedure based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) is described for determination of synephrine in solid and liquid dietary supplements. After the addition of 3,4-methylenedioxypropylamphetamine as internal standard (I.S.), a liquid-liquid extraction procedure in alkaline conditions with chloroform/isopropanol (9:1, v/v) was applied to the samples prior to analysis. Chromatography was performed on a fused capillary column and synephrine and I.S., derivatized with pentafluoropropionic anhydride, were determined in the selected-ion-monitoring (SIM) mode. The method was validated in the range 0.1-50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ or $\mu\text{g}/\text{ml}$ synephrine. Mean recovery ranged between 89.3% and 90.5% in both solid and liquid dietary supplements. The method was applied to analysis of various dietary supplements promoted for aiding weight control containing, apart from Citrus aurantium ephedrine alkaloids and methylxanthines. Amount of synephrine present in such products ranged from 3.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ solid product to 480.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liquid product. The main characteristics of the assay are the rapid and simple extraction and sample preparation procedures and total analysis time. Owing to the minimum handling and time required, this procedure can be useful when large stocks of food samples from different origin have to be processed.

Reference. Markus DM, Grollman AP. Ephedra free is not danger free. Science 2003; 301(5640): 1669-1671.

131

DETERMINATION OF CAFFEINE, NICOTINE, COTININE AND ARECOLINE IN HUMAN BREAST MILK

M. Pellegrini¹, E. Marchei¹, S. Pichini¹, R. Pacifici¹, O. Garcia-Algar², F. Vagnarelli³, P. Zuccaro¹

¹Department of Drug Research and Evaluation, Italian National Institute of Health, Rome, Italy

²Pediatric Service, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

³S.Maria delle Croci Hospital, Ravenna, Italy

Breast fed infants may be exposed to a variety of chemicals present in milk which may have untoward effects on immediate health and future development. The substances ingested by lactating mother are passed through the epithelial cells of the mammary glands to the milk and their concentration in this matrix depends on the dose ingested, the duration of the assumption, the amount of excreted daily milk, mother's health and her genotype. Caffeine, nicotine and arecoline (areca nut alkaloid) are the "drugs" more commonly used worldwide by consuming coffee and "coffee-like" drinks, tobacco products and betel nut. Many lactating mothers do not refrain from consuming these substances during breast feeding.

We developed rapid and simple liquid chromatography(LC) –tandem mass spectrometry (MS–MS) method for determination of above-reported drugs in human breast milk. A 1 mL amount milk with 10 ul of I.S. working solution was diluted with 2 mL 0.1M phosphate buffer. The solution was extracted with 2 aliquots of 2.5 ml chloroform/isopropanol (95:5, v/v). The organic phase with 2 ml pH 9.5 ammonium chloride was added to milk and the solution re-extracted with chloroform/isopropanol (95:5, v/v), evaporated to dryness and residue dissolved in mobile phase and injected into the HPLC column. The ESI conditions were: capillary voltage at 3.0 KV, cone voltage at 32 V, source temperature at 120 °C, desolvation temperature at 400 °C at a flow rate of 400 L/h, cone gas flow of 50 L/h. The collision gas was argon and the collision energy was 30 eV for all substance. The transition m/z 163→132 was selected for quantification of nicotine, m/z 177 →80 for cotinine, m/z 195→138 for caffeine and m/z 156→81 for arecoline. Up to now, 21 milk samples have been examined and 38% of the samples resulted positive to nicotine, caffeine and cotinine (nicotine principal metabolite), and 24% to only caffeine. The range of found concentrations was 2.9 ng/ml - 82.7 ng/ml for nicotine, 15.3 ng/ml -272.0 ng/ml for cotinine and 6.5 ng/ml - 221.8 ng/ml for caffeine. Only two samples from Asiatic mothers, who declared areca nut consumption, have been tested positive for arecoline. The range of found concentrations was 5.0 ng/ml - 80 ng/ml.

132

DOSAGGIO DEL CROMO IN PAZIENTI IN DIALISI

A. Tappi¹, C. Scarano¹, S. Dembech¹

¹Lab. Analisi 1, Azienda Ospedale-Università, Foggia

Scopo. Il cromo è un elemento essenziale ed ubiquitario, il cui assorbimento gastroenterico con acqua e cibi è regolato da meccanismi omeostatici. Il cromo trivalente è un elemento necessario per numerose funzioni, in particolare ha un ruolo attivo nella sintesi del fattore inducente tolleranza al glucosio, necessario per l'azione periferica dell'insulina.

Il cromo è stato dimostrato tossico per contatto cutaneo o per inalazione, induce mutazioni e modificazioni macromolecolari nelle sue specie stabili esavalenti e in quelle che si formano nel processo di riduzione a cromo trivalente. Il cromo ingerito viene ridotto rapidamente a cromo trivalente. L'escrezione in forma trivalente si verifica per via renale, e varia, dipendendo dal metabolismo renale.

Il valore medio della concentrazione di cromo nel siero di soggetti non professionalmente esposti è compresa fra 0.1-1 µg/l. Al fine di controllare l'accumulo di questo metallo, si è deciso di effettuare in una popolazione di dializzati, soggetti particolarmente a rischio, prelievi per il dosaggio del cromo.

Metodi. Lo strumento utilizzato è uno Spettrofotometro ad assorbimento atomico Varian con fornello di grafite. Le provette in uso della BD da 10ml senza additivi. I campioni diluiti con Triton-X allo 0.05%. 56 pazienti sono stati selezionati casualmente in una popolazione di dializzati.

Risultati. Solo 5 pazienti rientravano nei valori normali della popolazione non esposta.

Tutti gli altri mostravano valori di 4-5 volte superiori. Il 75% dei valori era compreso fra 1-6 µg/l.

Conclusioni. Le alte concentrazioni sieriche trovate nei pazienti suggeriscono un attento monitoraggio delle acque di dialisi e dei materiali utilizzati.

Bibliografia. Dal Farra M.. La correzione Zeeman, Laboratorio 200,1,44,1987. Grella, DE Filippis. La qualità delle acque in dialisi. Igiene e Sanità Pubblica, 1999. Apostoli. Aggiornamenti in tema di tossicità del cromo 2004 Documento sul cromo, AIFM.

133

EFFETTI DELLA MUTAZIONE DI CYP3A5 SULLA SOMMINISTRAZIONE DI TACROLIMUS NEL TRAPIANTO DI RENE. STUDIO PILOTA IN ADOLESCENTI

A. S. Tirelli¹, L. Ghio², E. Torresani¹, M. Travi¹, E. Arnaboldi¹, W. Xiaouchan², V. Martina², E. Meregalli², C. Mattiello¹, A. Edefonti²

¹U.O. Patologia Clinica e Biologia Molecolare Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

²U.O. Nefrologia e Emodialisi Pediatrica Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

I polimorfismi del gene CYP3A5 influenzano diversi aspetti della farmacocinetica e della farmacodinamica del metabolismo del farmaco immunosoppressore Tacrolimus(TAC)comprendendo in pazienti con trapianto renale (Tx) la concentrazione, la dose richiesta per raggiungere lo steady-state, la dose normalizzata per la concentrazione del farmaco. Abbiamo analizzato retrospettivamente la correlazione tra le mutazioni del gene CYP3A5 e i parametri farmacocinetici di TAC ottenuti 1, 2 settimane e 1, 3, 6, 12 mesi dopo Tx in 26 giovani pazienti adolescenti(età media $15,8 \pm 7,8$ anni). La dose iniziale di TAC era di 0,2 mg/kg alla scopo di ottenere un livello in sangue intero(C0)compreso tra 10-20 ng/ml per i primi 2 mesi dopo il trapianto e in seguito la dose veniva aggiustata al fine di raggiungere 5-10 ng/ml. Il genotipo di CYP3A5 è stato determinato tramite PCR seguito da sequenziamento diretto. TAC è stato dosato con metodo immunoenzimatico (Dade Behring). Durante i primi 3 mesi post Tx i pazienti(19)omozigoti (CYP3A5*3/*3) mostrano una maggiore concentrazione del farmaco rispetto ai pazienti(7)eterozigoti (CYP3A5*1/*3): $13,4 \pm 6,07$ ng/ml vs $7,82 \pm 2,12$ ng/ml a 1 mese($p=0,015$). Ai tempi successivi la concentrazione di TAC risulta invece simile nei due gruppi. Ciò dipende dalla significativa riduzione della dose giornaliera del farmaco necessaria per raggiungere la concentrazione prescelta: $0,13 \pm 0,06$ mg/kg vs $0,23 \pm 0,11$ mg/kg a 6 mesi($p=0,01$). La dose normalizzata per la concentrazione (ng/ml/mg/kg) risulta significativamente inferiore nei pazienti con CYP3A5*1/*3 per tutto l'intero periodo di osservazione: $33 \pm 22,16$ vs $71,12 \pm 37,81$ a 2 settimane($p=0,02$); $35,4 \pm 12,9$ vs $85,2 \pm 58,9$ a 6 mesi($p=0,04$). Anche il volume di distribuzione di TAC è fortemente influenzato essendo inferiore nei pazienti portatori di CYP3A5*3/*3 rispetto a quelli con CYP3A5*1/*3: $0,73 \pm 0,5$ vs $1,79 \pm 0,42$ a 6 mesi($p=0,001$). In conclusione il ruolo chiave della mutazione del gene CYP3A5 sulla farmacocinetica di TAC è in favore di uno screening dei suoi polimorfismi nei pazienti destinati a trapianto al fine di individualizzare la dose iniziale del farmaco immunosoppressore e raggiungere la concentrazione terapeutica già nelle fasi iniziali del trapianto diminuendo gli effetti collaterali.

134

MALATTIA CELIACA. STUDIO SULL'APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA DEL TEST DIAGNOSTICO (ANTICORPI ANTI TRANSGLUTAMINASI)

S. Baravelli¹, L. Pezzi¹, A. Vernocchi¹

¹U.O. Laboratorio Analisi AUSL di Forlì

Scopo dello studio. Valutare nella nostra popolazione la appropriatezza delle richieste di primo livello necessarie per la diagnosi di malattia celiaca. Sono state raccolte le richieste di un anno dei medici di medicina generali e degli specialisti del bacino di utenza afferente al laboratorio analisi centralizzato della AUSL forlivese e valutate le positività che hanno condotto alla diagnosi di celiachia.

E' stata valutata la richiesta, al momento dell'inquadramento diagnostico allorquando si sospetta una malattia celiaca, degli anticorpi anti trasglutamminasi di tipo Ig A che consente di ridurre il numero delle biopsie individuando pazienti ad alto rischio di celiachia.

Metodi. In un periodo di 12 mesi è stata registrata la richiesta di anticorpi anti tranlglutamminasi e valutata la positività di tale ricerca.

Risultati. Gli anticorpi anti trasglutamminasi sono stati richiesti 1780 volte ma solo in 26 casi essi sono stati individuati. L'età media dei pazienti risultati positivi è risultata di 24 anni in virtù delle 10/26 positività di pazienti in età pediatrica.

La biopsia gastrica è stata eseguita in 11 pazienti presso la nostra azienda confermando la diagnosi in 8/11 casi.

Conclusioni. Alla luce dell'alta sensibilità di tale test una positività pari al 1.6% dei casi dimostra come vi sia una indiscriminata e non del tutto appropriata richiesta di tale test che porta ad una spesa sociale di oltre 20.000 euro (costo tariffario del test 11,40 euro). Questa osservazione conferma la necessità di un dialogo più stretto fra il laboratorista ed il clinico esterno operante sul territorio come dimostra invece una richiesta più appropriata da parte dei clinici interni operati all'interno della nostra AUSL con i quali si è provveduto a condividere un protocollo diagnostico per la diagnosi di malattia celiaca.

Bibliografia. Maki M, Collin 1997 Celiac disease. Lancet 349, 1755-1759. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M et al 1997, Identification of tissue tranlglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature med.3,797-801. Troncone R., Maurano F., Rossi M et al 1999 IgA antibodies to tissue transglutaminase .an effective diagnostic test for celiac disease, J Pediatr 134, 166-171.

135

RISCONTRO OCCASIONALE DI COMPONENTI MONOCLONALI IN UNA SERIE DI 5481 DONATORI DI SANGUE

M. V. Ciarla¹, A. M. Bartolesi¹, M. Blasbichler¹, B. Capezzone de Joannon¹, N. De Luca¹, A. Di Luzio¹, D. Frattolillo¹, L. Lupis¹, P. Spiridigliozzi¹, R. Strom¹, G. Girelli²

¹Sez. Biochimica Clinica, Dip. Biotecnologie cellulari ed Ematologia, Università Roma Sapienza, Roma

²U.O.C. Immunoematologia / Centro Trasfusionale, Az. Policlinico Umberto I, Roma

Dal maggio 2005, in ottemperanza al D.M. 3.3.2005 (G.U. n.85, 13.4.2005), abbiamo eseguito elettroforesi delle sieroproteine in tutti i donatori afferenti al Centro Trasfusionale dell'Azienda Policlinico Umberto I di Roma. Materiali. 5481 donatori (5840 campioni, con alcune reiterazioni), età 29-65 anni (maschi 73,6%; femmine 26,3%).

Metodi. Elettroforesi delle proteine su Hydrigel 30 β 1 β 2 (Ditta Sebia), con quantizzazione densitometrica mediante software Phoresis. Immunofissazione (IFE) delle M-proteine (CM) su Hydrigel 4IF (Ditta Sebia) con antisieri anti-IgG, IgM, IgA, κ e λ legate e libere (Ditte Sebia e Dako). Ricerca della proteina di Bence-Jones (BJ) eseguita su campioni di urine concentrate (10X).

Risultati. Su 5481 donatori, presenti 35 CM (0,64%). Alla tipizzazione, 17 IgG (70,8%), di cui 8 κ (33,3%) e 9 λ (37,5%); 4 IgM (16,5%), di cui 1 κ (4%) e 3 λ (12,5%), 4 IgA (16,5%), di cui 3 κ (12,5%) e 1 λ (4%). Un caso di doppia CM IgG+IgA, sempre a catena leggera κ . Alla scansione densitometrica, 9 CM (37,5%) erano di ampiezza inferiore alle possibilità di risoluzione; 3 CM (12,5%) con valori tra 2 e 3 g/L, da classificare come MGUS; 12 CM (50%) con valori superiori a 3 g/L (sino a 11,8 g/L), da classificare come proteine mielomatose. Età media dei soggetti con CM: 48 anni (range 29-65). Nessuna distinzione di età o sesso tra MGUS e proteine mielomatose. BJ (di tipo λ) rilevata solo in 1 caso. In un caso con paraproteinemia M- λ di 2,7 g/L sembra essersi verificata, a distanza di 6 mesi, una parziale regressione quantitativa della componente monoclonale.

Conclusioni. I nostri dati si discostano da quelli di altri Autori per: minore età alla diagnosi (meno di 50 anni in oltre il 50% dei soggetti); elevata frequenza di proteine mielomatose (circa il 50%); pari frequenza di catene leggere κ e λ . Appare perciò assai importante sia la ricerca delle componenti monoclonali nei donatori di sangue, anche nell'età più giovane, sia uno studio più approfondito delle loro caratteristiche qualitative e quantitative e della successiva eventuale evoluzione patologica.

Bibliografia. Kyle RA, Rajkumar SV: Clin Lymphoma Myeloma 2005;6:102-114. Tichy M. e coll.: Cas Lek Cesk 2004;143:401-404. Pascali E e coll.: Boll Ist Sieroter Milan 1979;57:794-801.

136

VALUTAZIONE DELLA METODOLOGIA ENEASYSTEM PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI IGA VERSO LA TRANSGLUTAMINASI

F. Colistro¹, A. Minozzi¹, A. Santoni¹, T. Buongiorno², R. Putzulu²

¹Lab. Analisi, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma

²Bioallergy, Roma

Nel nostro Centro è da anni consolidata la ricerca di anticorpi IgA verso la transglutaminasi (tTG) con metodologia Eurospital (TS-Italia). Il metodo, EIA su micropiastra con antigene ricombinante umano, impiega Standard di Riferimento interno con range di curva 0-30 (Semi-quantitativo, Unità arbitrarie, Cut-Off = 7); gli ottimi valori di specificità e sensibilità clinici pongono il test nella fascia di 1° livello diagnostico (positivi confermati da EMA - IFI). L'interesse è attualmente volto ad individuare nei nuovi tests sul mercato, una metodologia che oltre a mostrare un elevato livello di accuratezza possa fornire, nell'ambito dei valori "positivi" indicazioni cliniche suppletive nell'iter diagnostico della malattia celiaca. La nostra routine, in tale settore, necessita inoltre di sistemi automatizzati ad elevata produttività ed affidabilità. Il sistema da noi valutato è ENEASYSTEM III (Bioallergy, Italia) impiega una metodologia EIA su fase solida, l'ACE, costituito da canali di reazione forgiati ad "U", coattati con antigene tTG ricombinante umano e ad elevata capacità legante. Il Sistema di Riferimento (Interno) mostra un range di curva 0-120 Unità arbitrarie con Cut-Off a 10. La correlazione è stata effettuata, in 2 fasi, con 51 e 78 campioni rispettivamente. La concordanza globale è risultata >90% e questo, unitamente alle caratteristiche strumentali proposte, ha posto il metodo alla nostra attenzione per ulteriori approfondimenti. Per i campioni positivi, i valori numerici espressi dai due metodi nell'ambito dei rispettivi range di dosaggio, seppur arbitrariamente, sono stati sottoposti a correlazione lineare ponendo il metodo in uso quale riferimento; anche in questo caso abbiamo osservato una buona concordanza. Crediamo però necessario, per correttezza analitica non avendo i due metodi un Riferimento Standard comune, confrontare i valori espressi di IgA tTG dai due metodi verso un riferimento obiettivo quale la determinazione EMA a varie diluizioni.

137

LIVELLI CIRCOLANTI DI MOLECOLE DI ADESIONE IN PAZIENTI CON OBESITA' VISCERALEG. Dogliotti¹, A. E. Malavazos², S. Giacometti³, E. Galliera¹, F. Ermetici², B. Ambrosi², M. M. Corsi¹¹Ist. Patologia Generale, Lab. Patologia Clinica, Università degli Studi di Milano, Milano²U.O. di Endocrinologia, Università degli Studi di Milano, Policlinico San Donato I.R.C.C.S., San Donato Milanese³Randox Laboratories Ltd, Italia

Le cellule dell'endotelio vascolare sono state considerate per molto tempo solo come cellule inattive ed unica barriera semipermanente tra il sangue ed i tessuti. Tuttavia, ci sono ora molte evidenze che portano a considerare il ruolo di tali cellule come importantissimo nel mantenere l'omeostasi vascolare nell'uomo. Nel nostro studio abbiamo considerato un totale di 40 soggetti divisi in 12 controlli sani e 28 pazienti con obesità viscerale. Abbiamo dosato le 5 molecole di adesione più importanti: ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina e L-selectina. Abbiamo utilizzato il sistema Evidence InvestigatorTM (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, United Kingdom), strumento che si avvale di supporti solidi sui quali sono legati gli analiti di nostro interesse: i biochip. A reazione avvenuta, il complesso formatosi (Ag/Ab) viene fatto reagire con un substrato legato all'enzima che promuoverà la seconda incubazione. Per poter determinare i valori dei vari analiti presi in esame si utilizza una reazione di chemiluminescenza, che risulterà proporzionale alla quantità di analita legato al sito specifico. La quantità di luce emessa dalle reazione viene determinata e quantificata usando una camera Charge Compld Device (CCD) che rileva simultaneamente tutti i siti di legame dei nove biochip. Dai nostri risultati risulta che nei nostri pazienti l'adiposità viscerale era associata con ICAM-1(34.15 + 11.23 vs 23.90 + 3.43)(p<0.05); per tutte le altre molecole studiate le differenze non erano statisticamente significative (p>0.05). Possiamo concludere dicendo che l'attivazione endoteliale sembra essere modesta in questi soggetti; questo ci porta a pensare che essendo l'attivazione endoteliale un marker di fase precoce dell'aterosclerosi, i nostri pazienti con obesità viscerale, in qualche modo non sono ancora in una fascia di rischio per quanto concerne il danno vascolare da aterosclerosi. Quindi possiamo dire che, essendo ormai noti i rischi vascolari correlati alla adiposità viscerale, i nostri pazienti, pur obesi (BMI > 30), e con un VAT > 130, non presentano ancora i segni di un'attivazione vascolare, tipica in questi pazienti.

138

LIVELLI CIRCOLANTI DI CITOCHINE E FATTORI DI CRESCITA IN PAZIENTI CON DIFFERENTI GRADI DI MALATTIA DI ALZHEIMERG. Dogliotti¹, S. Giacometti², E. Galliera¹, M. Chiappelli³, F. Licastro³, M. M. Corsi¹¹Ist. Patologia Generale, Lab. Patologia Clinica, Università degli Studi di Milano²Randox Laboratories Ltd Italia³Dip. Patologia Sperimentale, Lab. Immunologia, Università degli Studi di Bologna

Nella malattia di Alzheimer sono state recentemente studiate le anomalie funzionali del sistema vascolare; infatti sono molto frequenti patologie microvascolari cerebrali. In aggiunta l'analisi genomica ha evidenziato una up-regolazione di geni rilevanti nella angiogenesi in pazienti con Alzheimer. Abbiamo studiato in totale 96 soggetti divisi in tre gruppi: il gruppo controllo di 16 soggetti apparentemente sani, il gruppo Alzheimer con decadimento intermedio di 40 pazienti, ed il gruppo Alzheimer con decadimento grave di 40 pazienti. Abbiamo utilizzato il sistema Evidence InvestigatorTM (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, United Kingdom), strumento che si avvale di supporti solidi sui quali sono legati gli analiti di nostro interesse: i biochip. A reazione avvenuta, il complesso formatosi (Ag/Ab) viene fatto reagire con un substrato legato all'enzima che promuoverà la seconda incubazione. Per poter determinare i valori dei vari analiti presi in esame si utilizza una reazione di chemiluminescenza, che risulterà proporzionale alla quantità di analita legato al sito specifico. La quantità di luce emessa dalle reazione viene determinata e quantificata usando una camera Charge Compld Device (CCD) che rileva simultaneamente tutti i siti di legame dei nove biochip. Dai nostri risultati appare evidente che nei nostri pazienti con Alzheimer, abbiamo un aumento dei valori di VEGF rispetto ai controlli sani(41.84 + 15.23 ng/ml Vs. 222.60 + 182.43 ng/ml). I nostri dati sono in linea con la letteratura, infatti è noto come il deficit di VEGF sia correlato con ipoperfusione, neurodegenerazione e disfunzione vascolare. Inoltre il VEGF può legare i depositi di Ab, e peggiorare la prognosi della patologia neurologica.

139

LIVELLI CIRCOLANTI DI MOLECOLE DI ADESIONE IN PAZIENTI CON DIFFERENTI GRADI DI MALATTIA DI ALZHEIMER

G. Dogliotti¹, S. Giacometti², E. Galliera¹, M. Chiappelli³, F. Licastro³, M. M. Corsi¹

¹Ist. Patologia Generale, Lab. Patologia Clinica, Università degli Studi di Milano

²Randox Laboratories Italia Ltd

³Dip. Patologia Sperimentale, Lab. Immunologia, Università degli Studi di Bologna

I linfociti circolano attraverso il corpo per attuare il loro principale compito chiamato immunosorveglianza. Il traffico dei leucociti attraverso il sangue e i tessuti linfoidi e non linfoidi dipende dalla espressione di specifiche molecole di adesione. Abbiamo studiato in totale 96 soggetti divisi in tre gruppi: il gruppo controllo di 16 soggetti apparentemente sani, il gruppo Alzheimer con decadimento intermedio di 40 pazienti, ed il gruppo Alzheimer con decadimento grave di 40 pazienti. Abbiamo dosato le 5 molecole di adesione più importanti: ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina e L-selectina. Abbiamo utilizzato il sistema Evidence InvestigatorTM (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, United Kingdom), strumento che si avvale di supporti solidi sui quali sono legati gli analiti di nostro interesse: i biochip. A reazione avvenuta, il complesso formatosi (Ag/Ab) viene fatto reagire con un substrato legato all'enzima che promuoverà la seconda incubazione. Per poter determinare i valori dei vari analiti presi in esame si utilizza una reazione di chemiluminescenza, che risulterà proporzionale alla quantità di analita legato al sito specifico. La quantità di luce emessa dalle reazione viene determinata e quantificata usando una camera Charge Coupled Device (CCD) che rileva simultaneamente tutti i siti di legame dei nove biochip. Dai nostri risultati appare evidente che nei nostri pazienti con Alzheimer, abbiamo una diminuzione dei valori di P-Selectina e di L-Selectina rispetto ai controlli sani (36.55 + 15.98 ng/ml Vs. 12.82 + 4.99 ng/ml e 148.94 + 29.82 ng/ml Vs. 67.17 + 18.11 ng/ml rispettivamente). I nostri dati sono in linea con la letteratura, infatti sono noti studi che dimostrano un deficit immunitario nei pazienti con Alzheimer. La L-Selectina (CD62L), in particolar modo, pare sia ridotta nei pazienti con Alzheimer proprio per una attivazione adrenomedullare.

140

UNA NUOVA ORGANIZZAZIONE DEL LABORATORIO DI IMMUNOLOGIA CON L'INTRODUZIONE DI UN SISTEMA AUTOMATIZZATO EIA, ENEASYSTEM III

G. Di Rienzo¹, G. Ninivaggi¹, T. Colonna¹, S. Gentile¹, C. Robert¹, M. Guida¹

¹S.C. Patologia Clinica AUSL BA/3

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. Di recente i tests EIA, disponibili su analizzatori automatici, hanno aumentato la loro presenza nelle routine di laboratorio, rivelandosi validi strumenti di supporto e mezzi diagnostici alternativi, affidabili per precisione analitica ed efficienza clinica. Nel nostro laboratorio di autoimmunologia da sempre affidato a metodologia IFI, è stato introdotto, da quest'anno, il sistema automatico Eneasytem III (metodologia EIA non in micropiastra). Riportiamo qui l'impatto che tale sistema ha comportato nella nostra organizzazione. L'Eneasytem 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 o IgA o IgM. Tutti i tests sono quantitativi e le risposte (Unità arbitrarie) vengono calcolate su una Curva Standard di IgG, IgA o IgM. Il sistema è stato inizialmente posto in affiancamento alla metodologia IFI per una validazione clinica dei dati con ottime risultanze e come prevedibile, ci ha mostrato un'ottima efficienza nell'organizzazione dei flussi di lavoro riducendo i tempi di risposta e l'operatività del personale applicato. L'esecuzione simultanea di tutti gli antigeni (ANA screen, ENA screen, AGA e tTG) ha permesso di ottimizzare e semplificare la nostra routine, consentendoci di fornire al clinico una risposta affidabile, completa per l'intero profilo analitico richiesto in tempi molto più rapidi. Il sistema consente infatti di eseguire 150 tests in un tempo variabile da 90 a 110 min., per 30 campioni.

141

IL DOSAGGIO DI Ab ANTI-dsDNA AD ALTA AVIDITÀ CON METODO IMMUNOENZIMATICO (KIT FARRZYME PRODOTTO DA 'THE BINDING SITE') IN PAZIENTI AFFETTI DA LES: VALUTAZIONE AI FINI DIAGNOSTICI E NEL FOLLOW-UP, COME INDICE DI ATTIVITÀ DI MALATTIA

L. Giovannelli¹, E. Girolami¹¹Lab. Autoimmunità SIMT, Osp. Pediatrico Bambin Gesù, Roma

Background. I metodi comunemente usati per la ricerca degli Ab anti-dsDNA (IFA ed EIA) risentono, anche se in misura diversa, della presenza di Ab a bassa avidità, poco specifici e scarsamente significativi ai fini diagnostici, mentre il test di FARR (RIA), in grado di determinare soltanto gli Ab ad alta avidità, viene eseguito, a causa di problematiche metodologiche, soltanto da pochi laboratori. La disponibilità di un test commerciale di facile impiego, con le caratteristiche del test di FARR, potrebbe fornire uno strumento diagnostico di grande efficacia.

Scopo. Confrontare i risultati del FARRZYME con quelli dei test già in uso, relativamente a pazienti con LES in fase attiva o in remissione e ad un gruppo di controllo composto da pazienti con malattie autoimmuni diverse dal LES e da soggetti sani.

Metodi. Ricerca di Ab anti-dsDNA - mediante test IFA su *Crithidia lucilliae*, test EIA 'classico' (Bindazyme prodotto da 'The Binding Site'), test EIA per la ricerca di Ab ad alta avidità (Farrzyme prodotto da 'The Binding Site')- su campioni di siero di:

- gruppo A: n°14 pazienti con LES clinicamente attivo, tutti ANA positivi (titolo > 1:160);

- gruppo B: n° 17 pazienti con LES in remissione clinica, tutti ANA positivi (titolo > 1:160);

- gruppo C (gruppo di controllo): n° 43 sieri, 37 dei quali ANA positivi (titolo > 1:80),

provenienti da 22 pazienti con artrite idiopatica giovanile, 2 con connettivite mista, 3 con sclerosi sistemica, 2 con endocrinopatie autoimmuni, 1 con IPEX, 1 con piastrinopenia, 12 soggetti sani.

Risultati. Gruppo A: 12 positivi (86%) ai 3 test (100% di concordanza).

Gruppo B: 7 positivi IFA (41%), 4 positivi EIA (23%), 1 positivo FARRZYME (6%).

Gruppo C: 6 positivi IFA (14%), 8 positivi EIA (19%), nessun positivo FARRZYME (0%).

Conclusioni. La determinazione degli Ab anti-dsDNA ad alta attività, mediante il test 'Farrzyme', sembra avere specificità molto elevata (98% in questo studio) per il LES clinicamente attivo, pertanto può rappresentare un test di grande efficacia per la diagnosi e il follow-up dei pazienti con LES.

Bibliografia. Werle et al. *Lupus*, 1992;1:369-377.

142

METALLOPROTEINASES AND TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES IN PHYSIOLOGIC AND COMPLICATED PREGNANCIES

G. C. Guidi¹, M. Montagnana¹, A. Albiero², S. Scevarolli², G. L. Salvagno¹, M. Franchi², G. Lippi¹¹Sez. di Chimica e Microscopia Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona, Italia²Unità di Ostetricia, Dip. Materno ed Infantile, Osp. Policlinico, Verona, Italia

Aim. To evaluate matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and 9), mediators of vascular reactivity, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1 and 2) in preeclamptic women compared with normotensive pregnancies and non-pregnant women.

Methods. 14 preeclamptic women (proteinuria ³300 mg/24 h, two readings of systolic blood pressure ³140 mm Hg and diastolic blood pressure ³90 mm Hg) were compared with 37 normotensive pregnant women in different gestational and 21 non-pregnant women. Multiplexed sandwich enzyme-linked immunosorbent assay SearchLight Human MMP Array 1 (Pierce, Rockford, Ill) was used to measure MMPs and TIMPs. The enzyme-substrate reaction produces a chemiluminescent signal detected with a cooled CCD camera (Pierce). The images were analyzed by ArrayVision version 8.0 software (Imaging Research).

Results. Results are shown in table (median and interquartile range). The serum concentration of MMP-2 was significantly higher in preeclamptic women versus both controls (834 vs. 569 ng/ml, p=0.001) and physiologic pregnant women (834 vs. 669 ng/ml, p=0.01). There were no statistically significant differences for the others parameters tested.

Conclusions. MMP-2 is significantly higher in preeclampsia, suggesting that MMPs may exert a pathologic function in the vasculature of women with preeclampsia.

Reference. Merchant SJ, Narumiya H, Zhang Y, Guilbert LJ, Davidge ST. The effects of preeclampsia and oxygen environment on endothelial release of matrix metalloproteinase-2. *Hypertens Pregnancy* 2004;23:47-60.

	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)
Controls	569 (454-720)	241 (129-449)	194 (153-209)	200 (161-234)
Physiologic	669 (560-760)	388 (267-565)	176 (124-195)	228 (207-267)
Preeclampsia	834 (656-1002)*	293 (275-568)	213 (163-239)	232 (220-241)

143

VALUTAZIONE DI UN NUOVO KIT ELISA PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI ANTI PEPTIDI DEAMIDATI DELLA GLIADINA(DGP)

T. Imbastaro¹, C. Palmerini¹, A. Marini¹, F. Pistola¹

¹ U.O. Lab. di Patologia Clinica, Osp. Spirito Santo, ASL Pescara

Gli anticorpi anti gliadina sono presenti con una percentuale che va dall'80 al 90% nei sieri di pazienti con malattia celiaca non trattata, ma anche in condizioni cliniche diverse dalla celiachia. Nella diagnostica sierologica della malattia celiaca, test come EMA e tTG hanno dimostrato maggior sensibilità e specificità degli AGA. Recenti studi hanno dimostrato che gli anticorpi anti gliadina di pazienti con malattia celiaca si legano meglio alla gliadina che è stata deamidata tramite azione enzimatica della transglutaminasi.

In questo studio è stato valutato un nuovo test per la determinazione di anticorpi anti peptidi deamidati della gliadina (DGP), utilizzando 40 campioni di siero pediatrici già testati per EMA, tTG e AGA convenzionali.

8 campioni erano positivi per EMA e tTG, 28 negativi per EMA e tTG, ma positivi per AGA convenzionali G e/o A e 4 negativi per tutte e quattro le determinazioni. Gli Ab anti DGP A e G sono stati determinati utilizzando i kit ELISA forniti da INOVA Diagnostics.

Gli 8 campioni positivi per EMA e tTG appartengono a pazienti celiaci. Di questi 8, 6 (75%) sono risultati positivi per AGA convenzionali e 7 (87,5%) sono risultati positivi per Ab anti DGP G e/o A. I 28 campioni di siero negativi per EMA e tTG, ma positivi per AGA convenzionali, appartengono a pazienti non celiaci; 25 su 28 (89,2%) sono risultati negativi per Ab anti DGP.

I 4 campioni negativi per EMA e tTG e AGA erano tutti negativi per Ab anti DGP G e A.

In conclusione, 7 campioni su 8, risultati positivi per EMA e tTG, erano positivi anche per Ab anti DGP e 25 campioni su 28, negativi per EMA e tTG, erano negativi anche per Ab anti DGP, con una concordanza totale dell'89% (32/36).

Nonostante la relativa esiguità delle determinazioni effettuate, in via preliminare sembrerebbe che gli anticorpi anti DGP possano essere di valido aiuto nella diagnosi di malattia celiaca. Ovviamente sarà necessario effettuare ulteriori studi con un numero più elevato di casi.

Bibliografia. Aleanzi M., Demonte A.M., Esper C., Garcilazo S., e M. Waggner. 2001 Celiac disease antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. Clin. Chem. 47:2023-2028.

144

ENHANCED MATRIX METALLOPROTEINASE-9 LEVELS IN SERA FROM PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

M. R. Metelli¹, P. Bongioanni², F. Manzone¹, F. Fulceri¹, F. Berni¹, E. Panicucci¹, B. Rossi², P. Pietrini¹

¹Lab. of Clinical Chemistry, Dep. of Experimental Pathology, University of Pisa, Italy

²Neurorehabilitation Unit, Dep. of Neuroscience, University of Pisa, Italy

Introduction. Elevated levels of Matrix Metalloproteinase-9 have been reported to reflect peripheral nerve and muscle injury. To study the role of MMP-9 in neurodegeneration, we assayed MMP-9 in sera from amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients¹. In the present work, we increased size of our ALS study group and investigated correlations between MMP-9 serum levels and disease severity.

Materials and Methods. We assayed repeatedly over a two-year period soluble MMP-9 in sera from 69 ALS patients. Disease severity was scored by means of the ALS Functional Rating Scale, and patients subgrouped accordingly into 3 classes: I (scores between 40 and 31); II (scores from 30 to 11); III (between 10 and 0). Blood samples were drawn in the morning, and serum was stored immediately at -20°C. MMP-9 was measured by ELISA. We analyzed MMP-9 values overtime to identify any typical time-curve, and compared data at time of diagnosis (T0) with those collected at time of the most recent clinical examination (Tn).

Results. As already reported in our previous study¹, ALS patients had higher MMP-9 mean values than age- and sex-matched healthy controls (548 ± 395 vs 402 ± 145 ng/ml). Mean MMP-9 levels were increased, but not significantly, in class III vs class II vs class I patients at T0 (552 ± 507, 516 ± 366, and 396 ± 247 ng/ml, respectively) and at Tn (629 ± 192, 556 ± 335, and 541 ± 390 ng/ml, respectively).

Interestingly, whereas no significant differences were found among mean values of slowly progressive ALS patients (who remain within the same class of disease severity overtime), significant (p < 0.05) differences among MMP-9 mean values were observed for those patients shifting from class II to class III within the two-year study period (359 ± 215 vs 582 ± 162 ng/ml).

Conclusions. Our data further support the link of MMP-9 to neurodegeneration in a clinical setting: ALS patients suffering from the prototype of motor neuron disease showed enhanced MMP-9 serum values as compared to healthy subjects. Moreover, increased MMP-9 levels are related to clinical worsening, as if there was a direct relationship between MMP-9 serum levels and motor neuron degeneration underlying clinical symptoms.

References. Metelli et al. Biochimica Clinica, 29:209(2005)

145

PLASMA CYTOKINE LEVELS IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSISM. R. Metelli¹, P. Bongioanni², F. Fulceri¹, F. Manzone¹, C. Domenichini¹, E. Panicucci¹, B. Rossi², B. Pietrini¹¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Experimental Pathology, University of Pisa, Italy²Neurorehabilitation Unit, Department of Neuroscience, University of Pisa, Italy

Introduction. In neurodegenerative diseases unbalance between Th1-type cytokines (Interleukin(IL)-2,IL-12, Interferon (IFN)- λ , and Tumor Necrosis Factor(TNF)- α) promoting cell-mediated immune responses and Th2-type cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, and IL-10) modulating humoral responses might lead to a derangement in immune regulation and apoptosis modulation. The aim of the present study was to assay such molecules in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a prototype for neurodegenerative disease.

Materials and Methods. We assayed repeatedly over a two-year period plasma levels of IL-1, IL-2, soluble IL-2 receptor(sIL-2R), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, sIL-6R, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , sTNF-RI, sTNF-RII and IFN- γ in 73 patients with ALS. Disease severity was scored by means of the ALS Functional Rating Scale, and patients subgrouped accordingly into 3 classes: I (scores between 40 and 31); II (scores from 30 to 11); and III (scores between 10 and 0). Cytokine plasma concentrations were determined quantitatively by ELISA. We compared cytokine values at time of diagnosis (To) with those collected at time of the most recent clinical examination (Tn).

Results. Enhanced IL-2 and reduced sIL-2R and TNF- α mean values were found in all ALS patients at Tn vs T0, whereas no significant overtime differences were observed for the other cytokines, although a trend to decreasing levels along the follow-up period was noted. In patients remaining in their own severity class overtime increased plasma amounts of IL-2 ($p < 0.09$) and ($p < 0.03$), and decreased TNF- α levels, for class I and class II respectively, were observed at Tn vs To. In patients shifting from class I to class II significantly enhanced IL-2 values were found ($p < 0.01$) and from class I to class III (only 4 patients) decreased TNF- α and increased IL-10 values, at Tn vs To respectively.

Conclusions. Our findings of significantly changed amounts of two Th1-type cytokines (IL-2 and TNF- α) in plasmas from ALS patients overtime within the follow-up period support the hypothesis of their role in ALS pathophysiology; on the other hand, our data likely rule out a clear involvement of Th2-type cytokines (the observation of increased IL-10 levels in a very small patients'group is still too preliminary and needs to be confirmed).

146

RICHIESTE DI TEST SIEROLOGICI PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE AUTOIMMUNI: VALUTAZIONE COMPARATIVA DEGLI ANNI 2004-2005B. Porcelli¹, R. Pagani¹, M. Salvi², R. Vittoria², S. Martini², S. Petralia², L. Terzuoli¹¹Dip. Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Sez. Biochimica, Università degli Studi di Siena²Dip. di Medicina di Laboratorio, Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese

E' ormai sempre più consolidato il ruolo del Laboratorio Clinico nel miglioramento e nella standardizzazione della procedura diagnostica, nell'elaborazione del referto e nella valutazione dell'appropriatezza della richiesta. Nell'ambito di questa razionalizzazione, abbiamo voluto analizzare il numero di richieste per autoanticorpi anti-mitocondriali (AMA), anti-muscolo liscio (ASMA), anticellule parietali (PCA) e anti-microsomi (LKM), pervenute al nostro Laboratorio negli anni 2004 e 2005. Per l'analisi di questi autoanticorpi è stato usato un metodo di immunofluorescenza indiretta (Fluorokit, Diasorin).

Durante tutto l'anno 2004 i sieri dei pazienti sono stati diluiti con PBS 1:20, come suggerito dal kit, e la refertazione espressa solo in termini di positività o negatività. Dall'anno 2005, in sintonia con le linee guida, abbiamo adottato una diluizione iniziale di 1:80 e, in caso di positività, abbiamo proceduto alla titolazione, riportando, nel referto, l'ultima diluizione positiva.

Per l'anno 2004 il numero totale di richieste è stato pari a 503 ed i positivi 43 (8,5%) così distribuiti: AMA 16 (3,2%), ASMA 10 (1,9%), PCA 12 (2,4%), LKM 5 (0,9%).

Per l'anno 2005 il numero totale di richieste è stato pari a 905 ed i positivi 107 (11,7%) così distribuiti: AMA 12 (1,3%), ASMA 66 (7,3%), PCA 27 (2,9%), LKM 2 (0,2%). E' evidente l'aumento, in senso quantitativo, della richiesta (+ 36%), probabilmente dovuto in parte alla maggiore chiarezza e precisione del referto. Inoltre, il non equivalente incremento dei positivi totali (+ 3,2%) e la variazione delle singole percentuali dei positivi (AMA -1,9%; ASMA + 5,4%; PCA + 0,5%; LKM - 0,7%) è da attribuirsi al miglioramento della procedura diagnostica, che ci ha permesso di ottimizzare e standardizzare al meglio il tipo di dosaggio.

Per quanto evidenziato dai nostri dati rimarrebbe ancora da stabilire, nell'ambito di un'efficace attività coordinata con il mondo clinico, l'appropriatezza delle richieste dei test, che potrebbe comportare, da un lato, un relativo abbattimento dei costi e, dall'altro, permettere di arrivare a un'ottimizzazione dei percorsi diagnostici.

147

V75Q576 IL-4Ra VARIANT AND IL-4 -588T ALLELE FAVOUR cagA POSITIVE H. PYLORI INFECTIONS

A. Stranges¹, C. Zamboni², D. Basso¹, A. Marchetti³, S. Schiavon¹, M. Fasolo¹, F. Navaglia¹, A. D'Odorico⁴, P. Fogar², D. Nitti³, M. Plebani¹

¹Dep. Laboratory Medicine, University of Padova, Italy

²Dep. of Medical and Surgical Sciences, University of Padova, Italy

³Dep. of Oncological and Surgical Sciences, University of Padova, Italy

⁴Dep. of Surgical and Gastroenterological Sciences, University of Padova, Italy

Interleukin-4 (IL-4), which acts by binding to its receptor, IL-4Ra, affects the immune system and can modify gastric acid secretion. Our aim was to elucidate the relationships between IL-4 and IL-4Ra genetic polymorphisms, considered singly or as haplotypes, and H. pylori infection or H. pylori associated diseases. IL-4 -588CT, IL-4R 148AG, IL-4R 1652AG were assayed in 170 patients with gastritis (107 Hp+), 75 duodenal ulcer (66 Hp+), 144 non-cardia gastric cancer (91 Hp+). H. pylori ureA and cagA were PCR amplified from mucosal DNA; gastritis grade was assessed (H&E). Haplotypes were estimated by Arlequin software. Allele frequencies were: -588C=0.86, -588T=0.14, 148A=0.55, 148G=0.45, 1652A=0.84, 1652G=0.16. All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium. IL-4 or IL-4R single genotypes were neither correlated with disease diagnosis nor with H. pylori infection or gastritis grade. Considering gastritis patients IL-4 -588T allele was cagA associated ($X^2=9.12$, $p<0.01$). IL-4R haplotype frequencies, considering the 148AG and 1652AG loci, were: AA=48.6%, AG=6.0%, GA=35.2%, GG=10.2%. The GA haplotype (V75Q576 aminoacids combined in the same protein) was correlated with cagA ($X^2=4.42$, $p<0.05$). After patients with or without at least a GA haplotype were subdivided into different groups, the association between cagA and IL-4 -588T was confirmed only in those without GA haplotype ($X^2=4.04$, $p<0.05$).

Conclusions. IL-4R GA haplotype and IL-4 -588T allele favour cagA infections. The V75Q576 combination resulting from this haplotype may affect receptor functioning while IL-4 -588T allele may affect the amount of the secreted cytokine. These genetic variants may modulate IL-4 effect on gastric acid secretion and/or Th2 response.

148

VALUTAZIONE PRELIMINARE DELLA DETERMINAZIONE, MEDIANTE TECNICA ELISA, DEGLI ANTICORPI IgG E IgG4 SPECIFICI PER ALIMENTI IN PAZIENTI CON REAZIONI AVVERSE AD ALIMENTI (RAA)

S. Turchini¹, P. Boccaccini¹, L. Feroci¹, E. Sassi¹, O. Rossi¹, A. Matucci¹, A. Vultaggio¹, E. Maggi¹

¹Ente Dip. di Med. interna, Università di Firenze, DAI Biotecnologie SOD Immunoallergologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi

Negli ultimi anni, a seguito della disponibilità di test affidabili per la determinazione delle IgG specifiche per alimenti, alcuni Autori hanno mostrato interesse per tali indagini quale valido supporto nella diagnosi di RAA in particolare nelle forme con manifestazioni infiammatorie della mucosa intestinale (Zar et al, 2005). Atkinson (Gut 2004;53:1459-64) riporta dati significativi sull'impiego delle IgG specifiche alimentari quale utile supporto per la definizione e il monitoraggio della dieta di eliminazione. Tuttavia non tutta la letteratura è concorde con tali affermazioni, essenzialmente per il riscontro della presenza di elevati livelli di IgG e/o IgG4 specifiche per alcuni allergeni (i.e.:latte) anche nella popolazione normale. Per verificare il significato della presenza delle IgG specifiche verso alimenti in soggetti con patologie riferibili a RAA, su 55 pazienti afferenti al nostro centro: 13 con sintomi intestinali, 6 con sintomi intestinali e manifestazioni cutanee alimenti dipendenti, 11 con orticaria-angioedema da alimenti, 16 non alimenti-correlata ma con IgE positive e 9 con assenza di sintomi intestinali ma con IgE totali elevate (> 1000 U/ml) e presenza significativa di IgE specifiche; abbiamo confrontato la determinazione delle IgE specifiche (Unicap, Pharmacia) e la determinazione delle IgG e delle IgG4 specifiche per un pannello standard di 8 allergeni. A tal fine abbiamo utilizzato un sistema ELISA (Bioallergy srl - Fiumicino, Italia) su Eneasytem III; la quantizzazione del metodo (Unità arbitrarie) si basa sull'impiego di una curva di Riferimento con Standard IgG e IgG4 interno. Range IgG: 0-210 U/ml (cut-off, 70); IgG4: 0-30 U/ml (cut-off, 10). Il pannello di allergeni considerato è stato il seguente: latte, albume, merluzzo, grano, arachide, gamberi, pomodoro e mela. Una popolazione di 15 soggetti asintomatici e non allergici, è stata utilizzata come controllo. E' emersa una buona riproducibilità del metodo in esame sia per il dosaggio delle IgG che delle IgG4. I dati preliminari sono in fase di approfondimento per valutare il significato delle positività riscontrate ed identificare eventuali Cut-Off correlabili con la sintomatologia clinica.

149

FT3 AND FT4 ASSAYS ON UNICEL DXI 800 ANALYSER: ANALYTICAL PERFORMANCE AND METHOD COMPARISONL. Germano¹, L. Mongardi¹, E. Cocciardi¹, D. Marranca¹, P. Limone¹, M. Migliardi¹¹Laboratorio di Ormonologia, S.C. di Endocrinologia, Osp. "Umberto I", A.S.O. Ordine Mauriziano di Torino

The aim of this study was to evaluate the analytical performance of FT3 and FT4 assays on Dxl analyser (Beckman Coulter); we performed also a comparison with our routine methods, FT3 and FT4 AutoDELFIAs assays (PerkinElmer).

The Dxl assays are paramagnetic particle enzymochemiluminescent immunoassays; the FT3 is a 1-step labelled antibody method, the FT4 is a 2-step method.

The AutoDelfia assays are solid phase time-resolved fluoroimmunoassays both based on the back-titration principle (i.e. 2-step).

The analytical sensitivity of FT3 and FT4 (obtained from the standard curve as the value corresponding to 2 standard deviations below the mean signal of 22 zero standard replicates) was, respectively, 0.61 and 0.81 pg/mL.

The imprecision (% CV) was evaluated on 5 control sera: Lyphochek Trilevel (B) and Seronorm 1-2 (S). The FT3 mean values (pg/mL) were, respectively, 2.4 - 6.9 - 13.1 (B), 2.3 - 5.7 (S); for FT4 we obtained, respectively, 6.0 - 23.1 - 47.3 (B), 9.2 - 14.4 (S) pg/mL. The intra-assay %CVs on 21 replicates were, for FT3, 5.1 - 4.8 - 6.9 (B), 8.6 - 4.8 (S); for FT4, 4.3 - 2.6 - 2.3 (B), 4.5 - 2.4 (S). The inter-assay %CVs, determined in 52 runs with 3 (FT3) and 5 (FT4) different reagent lots, were, for FT3, 10.2 - 8.4 - 8.4 (B), 10.5 - 9.3 (S); for FT4, 6.9 - 3.6 - 4.4 (B), 5.7 - 4.4 (S).

The phosphate buffer dilution test (1:4 - 1:16), performed on 3 pools of sera with different FT3, FT4 and TBG levels, showed an increasing underestimation of free thyroid hormone (fTH) values with increasing dilution factor and fTH levels; the results, good for FT4, less satisfying for FT3, were overall acceptable and in line with the results normally obtained with other fTH assays.

The method comparison between AutoDelfia (x) and Dxl (y) was performed on 396 (FT3, range: 1.0 - 22 pg/mL) and 445 (FT4, range: 2.4 - 37 pg/mL) patient sera. In both cases we found a good association (Pearson correlation coefficient): $r = 0.932$, $p < 0.0001$ (FT3), $r = 0.964$, $p < 0.0001$ (FT4). The agreement (Passing & Bablock regression) was poor in the case of FT3 ($y = 0.47x + 1.04$), but it was considerably better for FT4 ($y = 0.86x - 0.45$).

In conclusion. FT3 and FT4 Dxl assays show good analytical performance and they appear to be able to provide clinically useful and reliable results.

150

PLASMA ADIPONECTIN ASSAY: METHODOLOGICAL COMPARISON OF THREE KIT METHODSD. Giannessi¹, M. Maltinti¹, S. Del Ry¹, C. Colotti¹, A. M. Sironi¹, A. Gastaldelli¹¹CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa

Introduction. Adipocytokines or adipokines are biologically active substances released by adipose tissue. Among these, adiponectin, a 244 amino acid protein present in human plasma and inversely related to visceral fat area, has a central role in different conditions: low levels of plasma adiponectin are associated with metabolic and vascular disease and could represent a further cardiovascular risk factor. Adiponectin exerts important effects on vasculature and appears to reduce the vascular inflammatory response. For this, the measurement of plasma adiponectin is assuming increasing importance in different physiopathological conditions. Many methods are commercially available and a methodological evaluation needs in order to compare data of different studies.

Aim. To evaluate the analytical performance of three ELISA methods for the adiponectin assay in human plasma.

Methods. The methods analysed were supplied from LINCO Res (US) (routinely used), B-Bridge Int. (Japan), and SPI-bio (France). Sensitivity, accuracy and variability were evaluated for each method. Plasma samples with different adiponectin concentrations (BMI 28.1 ± 0.74 Kg/m², mean \pm sem) were assayed using the three different methods.

Results. Sensitivity levels were 0.14 ± 0.05 ($n=12$), 0.02 ± 0.01 and about 0.5 ng/ml for LINCO, B-Bridge and SPI-bio and the respective working ranges (analyte determination with an imprecision lesser than 10%) were 1.5-100, 0.3-12, 5-150 ng/ml. Within-assay was 5.6, 4.4 and 11% and between-assay was 18% for LINCO. In all systems any matrix effect was ruled out by dilution tests. As to the plasma assay, B-Bridge and LINCO furnished superimposable values ($y = -0.47 + 1.11x$, $r = 0.98$, $n = 38$) while higher values were obtained by SPI-bio ($y = 2.24 + 1.24x$, $r = 0.89$, $n = 15$) ($p < 0.001$ vs Linco and B-Bridge, t test for paired data).

Conclusions. B-Bridge, using a three separate incubation steps, exhibits higher sensitivity and reproducibility levels while Linco kit is more rapid and easy to perform; however, all systems are able to reliably assay adiponectin content in blood samples.

Reference. Maahs DM, Ogden LG, Kinney GL et al. Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. *Circulation* 2005;111:747-53.

151

IL FRAMMENTO N-TERMINALE DEL PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B (NT-proBNP): STABILITÀ DEL DOSAGGIO IN CAMPIONI MANTENUTI 48 ORE A TEMPERATURA AMBIENTE

S. Lazzarini¹, P. Migliorini¹, C. Minneci², C. Martelli¹, M. Verdelli², A. Sarti², G. Tulli³, L. Doni¹

¹Lab. Chimica Clinica, Nuovo Osp. San Giovanni di Dio, Firenze

²Ambulatorio Scompeso Cardiaco, Nuovo Osp. San Giovanni di Dio, Firenze

³U.O. Rianimazione e Terapia Intensiva, Nuovo Osp. San Giovanni di Dio, Firenze

Lo scopo del nostro studio era quello di valutare la stabilità nel tempo di un dosaggio immunometrico per la determinazione quantitativa del frammento N-terminale del peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) nel plasma umano, utilizzando il sistema Dimension della ditta Dade Behring.

La misurazione del frammento NT-proBNP è un utile strumento sia per fini diagnostici che prognostici; il test è indicato per la stratificazione del rischio in pazienti affetti da sindrome coronarica acuta e da insufficienza cardiaca. Materiali e Metodi. Abbiamo selezionato 71 pazienti con scompenso cardiaco (CHF), provenienti sia dal reparto di Rianimazione e Terapia Intensiva che dall'Ambulatorio per lo Scompeso Cardiaco del nostro ospedale; tutti i soggetti partecipanti allo studio hanno dato il loro consenso informato, firmando un apposito modulo da noi predisposto.

I campioni sono stati raccolti in provette di plastica contenenti eparina di litio; per ciascun paziente sono state prelevate tre provette: una è stata centrifugata al suo arrivo in laboratorio ed il plasma è stato subito congelato a -80° C, le altre due sono state tenute a temperatura ambiente (senza centrifugazione) rispettivamente per 24 e 48 ore, seguendo poi i passaggi della prima provetta (centrifugazione e congelamento a -80° C del plasma ottenuto).

Prima dell'esecuzione del test i campioni sono stati portati a temperatura ambiente (22-28° C).

Risultati. Intervalli dei valori ottenuti (in pg/ml): Prima Provetta 75-27104, Seconda Provetta 86-25300, Terza Provetta 76-26342.

In 39 pazienti c'è stato un incremento del valore di NT-proBNP, mentre negli altri 32 c'è stata una diminuzione della concentrazione del frammento in esame.

Percentuale media di scarto: tra la Prima Provetta e la Seconda -0,3; tra la Prima e la Terza +1,4; tra la Seconda e la Terza +1,7.

Conclusioni. I dati raccolti dimostrano che la concentrazione di NT-pro BNP rimane stabile per almeno 48 ore in campioni non centrifugati e lasciati a temperatura ambiente.

Questa caratteristica facilita sia la raccolta del campione che il suo trasporto fino al laboratorio, consentendo la successiva determinazione di questo analita particolare riducendo al minimo gli errori nella fase pre-analitica.

152

HIGH-SENSITIVE INTERLEUKIN (IL)-6 MEASUREMENT: COMPARISON OF TWO KIT METHODS

W. Lubrano¹, M. Maltinti¹, P. Di Cecco¹, D. Giannessi¹, G. Zucchelli¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy

Background. Interleukin (IL)-6 may represent an early marker of inflammatory activation and may be an useful tool in different clinical conditions such as in risk stratification in patients with ischaemic heart disease. Aim. To verify the analytical performance of two different ultra-sensitive Elisa for IL-6 measurement widely used in laboratory practice.

Methods. Circulating IL-6 levels were measured by using Elisa methods supplied by Diaclone Research (Besancon, France) and by Biosource International (California, USA), respectively. Sensitivity, variability and accuracy were evaluated with both systems. Samples from healthy subjects and from patients with different cardiovascular diseases were assayed in parallel with both Elisa systems. Results. Analytical sensitivity level of Diaclone method was 0.33 ± 0.04 pg/ml, mean \pm sem; the working range (analyte determination with an imprecision lesser than 10%) was 2.2 - 50 pg/ml; between-assay variability resulted 23.5 ± 0.48 pg/ml (CV% 8.5, n=17) and 0.50 ± 0.06 pg/ml (31.6%, n = 6). For Biosource analytical sensitivity was 0.24 ± 0.04 pg/ml and the working range was 2.0 - 10 pg/ml.

IL-6 levels in healthy control subjects resulted 0.38 ± 0.05 pg/ml, n=40 for Diaclone and 1.0 ± 0.6 pg/ml, n=12 for Biosource. A linear relationship was observed within the results of the two methods ($r=0.78$, $p<0.001$ considering only the values lesser than 10 pg/ml). Correlation with other markers of inflammation such as C-reactive protein and Tumor necrosis factor alpha were also checked for both systems.

Conclusions. The analytical performance of both systems are similar and both methods are able to reliably measure IL-6 circulating levels. The working range, evaluated in routine conditions, was similar for the two methods and indicates that attention should be devoted when measuring IL-6 values lower than 2.0 pg/ml.

Reference. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L et al. relationship between interleukin-6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or non invasive strategy. JAMA 2001;2107-13.

153

TSH ASSAY ON UNICEL DXI 800 ANALYSER: ANALYTICAL PERFORMANCE AND METHOD COMPARISONM. Migliardi¹, L. Germano¹, L. Mongardi¹, M. Di Grazia¹, D. Marranca¹, P. Limone¹¹Laboratorio di Ormonologia, S.C. di Endocrinologia, Osp. "Umberto I", A.S.O. Ordine Mauriziano di Torino

The aim of this study was to evaluate the analytical performance of TSH assay on Dxl analyser (Beckman Coulter); we performed also a comparison with routine method, TSH Architect i2000 assay (Abbott).

The Dxl HYPERsensitive TSH assay is a paramagnetic particle enzymochemiluminometric "sandwich" immunoassay. The Architect assay is a paramagnetic particle chemiluminometric "sandwich" immunoassay.

The analytical sensitivity (obtained from standard curve as the value corresponding to 2 standard deviations above the mean signal of 22 zero standard replicates) was 0.002 mIU/L.

The functional sensitivity was calculated as TSH value corresponding to 15-20% CV in an inter-assay imprecision profile obtained on 6 serum pools (range: 0.008-0.280 mIU/L) in 13 runs during a 12-week period with 3 reagent lots. It was 0.015 mIU/L.

The imprecision (%CV) was evaluated on 6 control sera: Anemia Control (A), Lyphochek Trilevel (B), Seronorm 1-2 (S). The TSH mean values (mIU/L) were, respectively, 0.044 (A), 0.32 - 4.7 - 26.7 (B), 3.6 - 15.0 (S). The intra-assay %CVs on 21 replicates were 3.6 (A), 2.8 - 2.8 - 2.6 (B), 3.2 - 3.7 (S). The inter-assay %CVs, determined in 52 runs with 7 reagent lots, were 7.2 (A), 5.4 - 6.1 - 6.0 (B), 6.0 - 5.7 (S).

The dilution test for parallelism was performed on 2 pools, one from hypothyroid sera (H), the other from sera of patients submitted to Thyrogen test (T). The results were evaluated as comparison between calculated (x) and measured (y) values with Pearson coefficient (r) and Passing&Bablok regression analysis (P&B); we obtained in both cases a very good association ($r=0.999$, $p<0.0001$) and agreement (H: $y=0.96x-0.38$; T: $y=1.00x-0.11$).

The method comparison between Architect (x) and Dxl (y) was performed on 488 patient sera (range: 0.001-90 mIU/L) and we found a very good association ($r=0.996$, $p<0.0001$) and agreement (P&B: $y=1.08x+0.016$). Considering only the patients with a low TSH level (<0.3 mIU/L, $n=94$) the association remained good ($r=0.983$, $p<0.0001$), while the P&B showed a slight overestimation of Dxl compared to Architect ($y=1.21x+0.004$).

In conclusion. The Dxl assay shows good analytical performance, peculiar to third generation method, and it appears to be able to provide clinically useful and reliable results.

154

LA MISURA DELLA PROLATTINA E LO SCREENING DELLA MACROPROLATTINEMIA: LA REALTA' DELLE REGIONI PIEMONTE E VAL D'AOSTAM. Migliardi¹, R. Alfieri¹, G. Antonini¹, E. Aroasio¹, M. Cassinari¹, M. Cristoferi¹, G. Mengozzi¹, G. M. Micca¹, R. Sconfienza¹, G. L. Visconti¹¹Gruppo di Lavoro "Immunometria", Sez. regionali SIBioC Piemonte e Valle d'Aosta

Il Gruppo di Lavoro Immunometria (GdL) ha scelto quale tema per il 2006 quello delle interferenze, in quanto causa frequente di errori analitici da cui possono scaturire approfondimenti diagnostici non necessari e/o scelte terapeutiche inappropriate. Come modello tipico di problematica laboratoristica e interpretativa è stato scelto quello della macroprolattina (MPRL).

Il GdL ha inviato ai Laboratori del SSN di Piemonte e Val d'Aosta un questionario utile per delineare un quadro della situazione esistente e per formulare ipotesi circa le azioni da intraprendere. Ventuno laboratori hanno risposto al questionario per un totale di 46100 test di prolattina eseguiti nel 2005 (66% del totale regionale). I metodi più utilizzati sono: ADVIA Centaur (23.8%), Architect i2000 (28.2%), Immulite 2000 (16.2%), Modular E170 (11%), AutoDELFLIA (9.8%); il restante 11% dei dosaggi viene eseguito con AIA 1800 e PROL-CTK-4 IRMA. A seconda dei laboratori, le femmine costituiscono dal 68 al 91% dei soggetti; gli iperprolattinemicici (iperPRL) oscillano fra il 5.6-25.2% (F) e il 7.8-27.5% (M). A seconda del metodo, la prevalenza di iperPRL varia da 8.3 a 26.4%. Considerando per ciascun metodo la prevalenza di MPRL negli iperPRL (5-24 % [1]) e il numero annuo di soggetti iperPRL (6900 ca.), è possibile stimare che 1075 soggetti circa risultano iperPRL a causa della MPRL.

Otto laboratori su 21 (19144 dosaggi/anno, 41.5%) eseguono di routine lo screening della MPRL sugli iperPRL (test di precipitazione con PEG) ottenendo risultati conformi a quelli della letteratura.

Dall'analisi dei dati emerge l'importanza della standardizzazione dei metodi (intervallo valore medio di recupero SI 84/500: 95-117%; intervallo bias medio osservato: -11 - +37%, fonte UK-NEQAS 2004), dell'intervallo di normalità utilizzato e dell'influenza esercitata dalla MPRL su ciascun metodo.

Nel futuro il GdL si propone di elaborare delle raccomandazioni (criteri di scelta di un metodo per la prolattina e di definizione degli intervalli di normalità, modalità esecutive e di refertazione del test per la MPRL) da sottoporre a tutti i laboratori regionali che operano in questo campo.

Bibliografia. Fahie-Wilson M et al. Macroprolactin; high molecular mass forms of circulating prolactin. *Ann Clin Biochem* 2005;42:175-192

155

PRELIMINARY ANALYSIS OF CHOLESTEROL METABOLISM IN HUNTINGTON DISEASE PATIENTS AND R6/2 MICEV. Leoni¹, M. Valenza², C. Mariotti¹, P. Soliveri¹, S. Genetrini¹, E. Cattaneo², S. Di Donato¹¹Division of Biochemistry and Genetics, National Institute of Neurology "C.Besta", Milan, Italy²Department of Pharmacological Sciences, Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases, University of Milan, Milan, Italy

Cholesterol plays a structural and functional role in the brain. De novo synthesis is responsible for almost all brain cholesterol content. For maintenance of homeostasis, cholesterol is converted by the neuronal specific cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) into its more polar metabolite 24S-hydroxycholesterol (24OHC). In principle, the CSF levels of 24OHC reflect active neurodegeneration, whereas 24OHC levels in the circulation reflect the number of metabolically active neurons, and thus the volume of the brain grey matter. Accordingly, plasma 24OHC should decrease in parallel to brain atrophy. In some neurodegenerative disorders such as Alzheimer disease and Multiple Sclerosis, plasma and CSF levels of 24OHC were shown to significantly differ from control values.

Recent data have suggested impaired cholesterol biosynthesis in the brains of HD patients and R6/2 mice.

Results. HD R6/2 mice. Brain samples were collected from five 10 week-old R6/2 and five age-matched WT mice. The lipids were extracted by 10 mL of chloroform: cholesterol, lathosterol and oxysterols were analyzed by isotope dilution-mass spectrometry. The levels of lathosterol in R6/2HD mice WT mice were significantly lower than those in WT mice (3.19 ± 0.56 versus 13.3 ± 1.3 ng/mg wet weight, $P < 0.001$).

HD patients. Plasma and CSF samples were collected in the same day from 14 HD patients. The CSF 24OHC levels resulted significantly higher (2.99 ± 1.00 vs 1.57 ± 0.58 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$) than those of Controls ($n=50$). Also plasma 24OHC levels (59.2 ± 20.1 vs 78.5 ± 23.8 $\mu\text{g/L}$) were significantly lower in HD patients than in age-matched controls ($P < 0.001$).

The low levels of lathosterol observed in the brain of R6/2 mice indicates a severe impairment in brain cholesterol synthesis. These data match our previous findings consistent with a reduced expression of some key enzymes in the cholesterol synthetic pathway. In HD patients we evidenced that plasma 24OHC levels were significantly reduced, suggesting a possible link with progressive brain atrophy, whereas increased CSF levels of 24OHC suggest concomitant increased cholesterol turnover. The analysis of plasma and CSF determination might help in evaluating the neurodegenerative process in Huntington Disease.

Reference. Valenza M et al. J Neurosci 2005;25:9932.

156

COMPREHENSIVE LIPID AND LIPOPROTEIN PROFILE IN UNCOMPLICATED PREGNANCIES.G. Lippi¹, A. Albiero², M. Montagnana¹, G. L. Salvagno¹, S. Scevarolli², M. Franchi², G. C. Guidi¹¹Sez. di Chimica e Microscopia Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Osp. Policlinico, Verona, Italia²Unità di Ostetricia, Dip. Materno ed Infantile, Osp. Policlinico, Verona, Italia

The pregnancy produces a wide series of metabolic and endocrine adaptations that also influence the lipoprotein metabolism. To evaluate such changes, a comprehensive lipid and lipoprotein profile was evaluated in 37 women with uncomplicated pregnancies at different gestational ages (10 in first, 10 in second and 17 in third trimester of pregnancy) and compared to that of 21 non-pregnant women as control. Conventional lipid parameters, including total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TG), were evaluated on the Modular System P (Roche Diagnostics GmbH). Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was quantified by the formula of Friedewald, the atherogenic index of plasma (AIP) was quantified by the formula $\log(\text{triglycerides}/\text{HDL-C})$, whereas lipoprotein(a) was measured on BN II nephelometric analyzer (Dade Behring GmbH). Results are synthesized in table 1 (mean \pm standard deviation). All the lipid parameters tested were significantly modified by the gestational age; in particular, women in the second and third trimester displayed significantly increased TC, LDL-C, HDL-C, CT/HDL, Lp(a) and AIP (third trimester only) when compared to either the control population or the subgroup of women in the first trimester. We conclude that the pregnancy produces substantial modifications of the lipoprotein metabolism, beginning from the second trimester.

	Control women	Pregnant women		
		1st trimester	2nd trimester	3rd trimester
CT, mg/dl	186 \pm 28	173 \pm 18	243 \pm 53††	262 \pm 37††
TG, mg/dl	77 \pm 34	79 \pm 27	151 \pm 80††	246 \pm 73††
HDL-C, mg/dl	69 \pm 10	67 \pm 12	83 \pm 19††	81 \pm 17††
LDL-C, mg/dl	101 \pm 26	90 \pm 17	130 \pm 46†	132 \pm 37††
CT/HDL-C	2.7 \pm 0.5	2.6 \pm 0.4	3.0 \pm 0.8	3.4 \pm 0.7††
AIP	0.01 \pm 0.20	0.05 \pm 0.17	0.22 \pm 0.23†	0.47 \pm 0.17††
Lp(a), mg/l	161 \pm 119	157 \pm 130	361 \pm 319††	349 \pm 405††
		† p < 0.05 to controls †† p < 0.05 to 1st trimester		

157

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI COLESTEROLO IN UNA POPOLAZIONE PEDIATRICA NAPOLETANA

L. Picone¹, A. Maglione¹, G. Ricci¹, P. Antonelli¹, G. de Porcellinis¹, G. Miranda¹, A. De Rosa¹

¹Struttura Complessa di Patologia Clinica, Ospedale Santobono, Napoli. Resp. Dott. Antonio de Rosa

La presenza presso il nostro Ospedale Pediatrico di un punto prelievi a cui afferiscono piccoli pazienti, inviati in genere dal Pediatra di base, ci ha permesso di raccogliere un discreto archivio di dati riguardanti, tra l'altro, le concentrazioni ematiche del colesterolo.

Tale analita è un indice di assetto lipidico che ha assunto grande importanza anche in campo pediatrico per il diffondersi dell'allarmante fenomeno dell'obesità.

Obiettivi. Valutare l'incidenza dei soggetti ipercolesterolemici analizzando i nostri dati relativi al quadriennio 2002-2005.

Materiali e Metodi. Il numero totale di soggetti esaminati è stato di 495, di cui 183 appartenenti alla fascia prescolare compresa nell'intervallo 3-6 anni (91 femmine, 92 maschi), e 312 alla fascia 7-12 anni (172 maschi e 140 femmine).

Il dosaggio del colesterolo ematico è stato eseguito su un analizzatore Olympus AU 640 con il metodo enzimatico Colesterolo ossidasi/Perossidasi.

Risultati. Abbiamo assunto come valore discriminante la concentrazione plasmatica di 200 mg/dl di colesterolo. Nella prima fascia solo il 5,4% dei soggetti ha presentato un valore superiore al cut-off scelto (4,3% maschi e 6,5% femmine). Nella seconda fascia tale percentuale è salita al 12,5% (11,6% maschi e 10,3% femmine).

Conclusioni. In entrambe le fasce la percentuale di individui con iper-colesterolemia è più o meno equamente distribuita tra i due sessi, ma essa subisce un netto incremento nei bambini con età tra 7 e 12 anni.

Le possibili cause di questa maggiore incidenza sono da ricercare in una probabile slatentizzazione di una patologia a carattere familiare e/o in una modifica nelle abitudini alimentari del bambino nell'età scolare.

Bibliografia. American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Cholesterol in childhood. Pediatrics 1998; Regione Campania – Piano Sanitario Regionale 2002-2004

158

NEL TERZO MILLENNIO HA ANCORA UN SIGNIFICATO DOSARE IL CK MB COME ATTIVITÀ CATALITICA?

E. Aroasio¹, G. Lanfranco²

¹Lab. Analisi, Osp. S. Luigi Gonzaga, Orbassano

²Lab. Nefrologia, Osp. Molinette Università di Torino, Torino

L'incidenza delle malattie cardiovascolari è in diminuzione, ciò nonostante queste rimangono la causa principale di morbilità e di mortalità nei paesi occidentali; i marcatori cardiaci aumentano d'importanza, sia nella diagnosi precoce, sia nella ridefinizione di infarto miocardico con le troponine cardiache.

Il dosaggio dell'attività dell'enzima CK e del suo isoenzima MB è stato utilizzato in questa patologia sin dagli anni '70, recentemente mioglobina e CKMB massa, hanno dimostrato una maggior sensibilità nella diagnosi precoce di infarto.

Ancora oggi sono numerosi i laboratori che continuano a dosare l'isoenzima CKMB come attività catalitica, sebbene questa metodologia presenti, a livello dei valori più significativi dal punto di vista clinico, una eccessiva variabilità analitica. Inoltre nell'ischemia e nella successiva necrosi tissutale, che è alla base del rilascio del CK e del suo isoenzima MB da parte delle cellule miocardiche lese in modo irreversibile, si formano radicali liberi, che aumentano ulteriormente nel corso della riperfusione; questi radicali liberi dell'ossigeno (ROS-)¹, agendo sul sito catalitico dell'enzima, determinano una diminuzione dell'attività che non è riattivata neppure con l'aggiunta di NAC. In 71 pazienti, 48 con diagnosi di IMA "gruppo 1" e 23 non IMA (1 miolisi, 1 politrauma e 21 post intervento chirurgico con importante azione traumatica sulla muscolatura) "gruppo2", abbiamo dosato il CK MB sia come espressione di attività che di massa e calcolato il rapporto CK att/CK massa²; sono stati dosati anche il CK totale e gli isoenzimi per verificare l'eventuale presenza di macro CK (I o II) e di CKBB che avrebbero alterato il calcolo dell'attività specifica. I valori medi nel "gruppo1" sono CK totale 1684.90 U/L, CKMB 188.21 U/L, CKMB 197.51 ng/mL, rapporto CKMB att/massa 1.69; nel "gruppo2" sono CK totale 7395 U/L, CKMB 164.23 U/L, CKMB 64.40 ng/mL, rapporto CKMB att/massa 3.54. Questi risultati preliminari che mostrano la differenza statisticamente significativa tra i due gruppi riguardo al rapporto attività/massa inducono ad affermare che l'utilizzo del dosaggio del CK MB come attività sia da scoraggiare fortemente nella diagnosi e nel follow up dell'IMA.

159

VALORE PROGNOSTICO TROPONINA I (DEDICATO ALL'AMICO P. BONVICINI)

F. Bruccoleri¹, A. Fusco¹, F. Bondanini¹, G. C. Cociolillo¹, I. Curiel¹, L. Fabretti¹, R. Gagliassi¹, P. Simeoni¹, G. Ferraiolo², V. Lukic², D. Esposito²

¹ASL RMB, UOC Lab. Biochimica Clinica, Ospedale S. Pertini, Roma

²ASL RMB, Unità Terapia Intensiva Coronarica Ospedale S. Pertini, Roma

Scopi. Dimostrare che la Troponina I può essere usata anche per la PROGnosi nei pazienti con IMA, analogamente a quanto avviene con il CK-MBmas, impostarne i limiti decisionali per le situazioni cliniche (reinfarto) ed ai fini prognostici. Saggiare alcune ipotesi fisiopatologiche della persistenza di elevati livelli di TNI in alcuni pazienti

Materiali e Metodi. Campioni di plasma Li-eparina di pazienti ricoverati (2004-2005) in UTIC e monitorati con TNI e CK-MBmassa, selezione di coppie di esiti. Le determinazioni sono state eseguite con sistemi analitici RXL-Dimension della Dade Behring

Risultati. L'andamento dei 2 Marcatori studiato su 200 coppie mostra una curva polinomiale che permetterebbe la previsione del valore dell'uno conoscendo l'altro:

$y = 0,11x^2 - 3,79x + 16,0$ con correlazione $R = 0,75$.

I dati-pazienti sono stati quindi raggruppati (storico cartelle UTIC) come STEMI ed NSTEMI (ST e Non ST Elevation Myocardial Infarction). Le risposte(esprese come val.esito/valore rifer.superiore) mostrano netta differenza nella correlazione del gruppo STEMI ($R=0.87$) rispetto a NSTEMI ($R=0.40$).

Infine abbiamo selezionato campioni al picco di risposta di 15 pazienti che mantenevano nel tempo elevati livelli di TNI. Non sembra molto chiaro in letteratura il significato fisiologico di questo dato anche se sono stati descritti problemi metodologici, comuni a tutti gli esami immunometrici.

Facendo prove di precipitazione con PEG su tali campioni e, come controllo, su campioni con TNI <40 ng/ml abbiamo avuto in 2 pazienti (NSTEMI) precipitazione >80% mentre il controllo ha mostrato precipitazioni <30% Conclusioni.

-L'evento con STEMI potrà essere monitorato o con CK.MB massa o con la TNI, non dimenticando la maggiore specificità di TNI

-Il monitoraggio di pazienti NSTEMI potrà essere impostato con entrambi i marcatori

-Picchi e persistenza della TNI non correlati alla clinica, dovranno prevedere l'eventualità di macrocomplessi o altro, per la corretta prognosi

Bibliografia. Yan AT, Yan RT, Tan M, Chow CM, Fitchett D, Stanton E, Langer A, Goodman SG: Troponin is more useful than creatine kinase in predicting one-year mortality among acute coronary syndrome patients. Eur Heart J. 2004 Nov;25(22):2006-2012.

160

BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE IN EMERGENCY PATIENT: SIENA PRELIMINARY EXPERIENCE

F. Carlucci¹, M. Salvi², S. Petralia², O. Cutaia², A. Tabucchi¹

¹Dip. di Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Univ Siena, DAI Med. Lab.

²DAI Medicina di Laboratorio UOC Analisi Cliniche, Az. Osp. Univ. Senese

Background. In the last years natriuretic peptides have assumed a foreground role in the evaluation of patients affected by cardiovascular diseases. They are synthesized and secreted as a response to ventricular volume expansion and pressure overload. In particular the BNP pro-hormone is synthesized and cleaved into biologically active BNP and NT-proBNP, being the last more stable in blood and reliable measurable in laboratory. The objective of present study is to evaluate the accuracy of NT-proBNP in differentiating heart failure from pulmonary affections in patients admitted to emergency department for acute dyspnea.

Methods. The first phase of study focused on selecting the patients with acute dyspnea admitted to the emergency department and adding the dosage of NT-proBNP to the other advised hematochemical tests. The evaluation of NT-ProBNP was performed by electroluminescence immunoassay "ECLIA" on the Roche Modular Analytics E170 immunoassay analyzer. The analytical range extends from 5 to 35.000 pg/ml with an analytical sensitivity 5 pg/ml. Normal range is as follows: <100 pg/ml in men and <150 pg/ml in women.

In the subsequent phase NT-proBNP values in the patients were analyzed in relation to initial diagnostic suspect and to definitive diagnosis formulated in the following 24-48 h by cardiologist.

Results and Conclusion. In the ten patients considered, admitted to the emergency department for acute dyspnea, initial diagnosis was cardiac pathology in 90% of the cases. The cardiologist, in the light of informations deriving from echocardiography, ECG, chest X-ray and blood tests ascribed dyspnea to cardiac pathology in 70% of the patients.

In the patients affected by pulmonary disease Nt-pro-BNP values were lower than 150 pg/ml; while patients with cardiac pathology even though asymptomatic values were significantly higher.

The study confirms the importance of rapid measurement of NT-proBNP in the emergency department for an improvement of the management of patients presenting with dyspnea, and thereby reducing the time to discharge and the total treatment cost.

References. Cost-effectiveness of B-Type Natriuretic Peptide Testing in Patients With Acute Dyspnea. Mueller C. et al. Arch Intern Med.166:1081,2006.

161

INTERFERENZA NEL DOSAGGIO DELLA TROPONINA I CARDIACA

M. Daves¹, R. Cemin², G. Sacco³, G. Roscia³, G. Cosio¹, F. Rizza¹

¹Lab. di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano

²Divisione di Cardiologia, Azienda Sanitaria di Bolzano

³Pronto Soccorso e Astanteria, Azienda Sanitaria di Bolzano

Scopo del lavoro. I metodi immunometrici sono molto sensibili e specifici ma purtroppo non sono esenti da interferenze, a volte difficili da individuare.

Materiali e Metodi. Riportiamo un caso di interferenza positiva nel dosaggio della troponina cardiaca I, (cTnI) in un paziente giunto in pronto soccorso per dolore toracico trafittivo della durata di pochi minuti. Il dosaggio della mioglobina risulta essere nella norma mentre cTnI (Access2 Beckman Coulter) risulta di 0.15, valore diagnostico di interessamento miocardico. Il paziente viene ricoverato e valutato (visita cardiologica, ECG, ecocardio) i rilievi diagnostici risultano tutti nella norma. Il giorno successivo al ricovero viene ripetuta la determinazione di cTnI che risulta essere 0.14, quindi sempre positiva. Data la discordanza tra il dato di laboratorio e la clinica, nasce il sospetto di un possibile agente interferente. Essendo riportato in letteratura che la presenza di interferenti provoca una mancanza di linearità tra diluizioni scalari del campione, ne viene allestita una serie (1:2, 1:4, 1:6,1:10) che riporta valori del tutto anomali 0.04, 0.02, 0.08, 0.13 ng/ml rispettivamente. Il dosaggio del fattore reumatoide risulta negativo. A questo punto decidiamo di eseguire sullo stesso campione il dosaggio della Troponina cardiaca T, mediante altro metodo (Elecys 2010 Roche Diagnostics): il dosaggio risulta essere negativo.

Discussione. Il sospetto di un'interferenza, probabilmente da anticorpi eterofili, deve essere sempre considerato quando vi sia discordanza tra dati di laboratorio, altre indagini strumentali e clinica del paziente: è chiaro che in questi casi si rende necessaria una stretta collaborazione tra medici (consulenti) di laboratorio e clinici.

Bibliografia. Emerson JF, Ngo G, Emerson SS. Screening for Interference in Immunoassays. Clin Chem 2003;49:1163-69.

162

INCREASE IN PLASMA ADRENOMEDULLIN AFTER RESYNCHRONISATION THERAPY IN NON RESPONDERS AT 6-MONTH FOLLOW-UP

S. Del Ry¹, M. Morales¹, U. Startari¹, M. Maltinti¹, C. Prontera¹, L. Panchetti¹, M. Emdin¹, D. Giannessi¹, M. Piacenti¹

¹CNR Clinical Physiology Institute, Pisa, Italy

Background. In patients (pts) with severe heart failure (HF) and left ventricular (LV) dyssynchrony, resynchronization therapy (CRT) may determine clinical benefits, inverse remodeling and reduction in plasma BNP. Other peptides, such as adrenomedullin (AM) are elevated in CHF; AM has a multi-tissue origin, being derived not only from heart and vessels but also from adrenal medulla and lung.

Aim. To assess whether CRT induces changes in these neuropeptides and if these changes are related to clinical and functional parameters.

Methods. A group of 23 pts in NYHA Class III-IV, complete left bundle branch block on baseline ECG and echocardiographic documentation of inter- and intra-ventricular dyssynchrony treated by CRT, were enrolled in the study. Clinical examination, 2D echo and AM and BNP assays were performed before device implantation and at 6-month follow-up (FU). Pts were divided in two groups, according to clinical parameters: Responders (Re) (16 pts): >1 NYHA Class improvement, no hospitalisation or increase in medication in the FU period and non responders (NRe) (6 pts): < 1 NYHA Class improvement, at least 1 hospitalisation for worsening HF and increase in medication. The groups were comparable for age, cause of disease, type of medication and NYHA Class before implantation.

Results. A significant increase in LVEF was observed only in Re (24.6±1.3% vs 28.9±1.8%, p<0.05, NRe: 25.5±3.2% vs 27.1±3.1%, NS), together with a reduction in LVESD, as compared to baseline, (Re: 59±2 vs 53±3 mm, p<0.05; NRe 56±3 vs 53±4 mm, NS). BNP level was reduced significantly only in Re (499±107 vs 193±63 pg/ml, p<0.001; NRe 605±180 to 388±133 pg/ml, NS). A significant reduction in AM was found in Re from 29.1±3 to 18.6±1.6 pg/ml (p<0.01), while AM significantly increased in NRe from 19.1±2 to 31.3±3.4 pg/ml (p<0.05).

Conclusions. Plasma BNP level are decreased significantly after CRT only in pts who show clinical improvement. AM level increase after CRT may likely indicate a compensatory neurohormonal response in NRe.

Reference. Eto T, et al. Regulation of production and secretion of AM in the cardiovascular system. Regulatory Peptides 112:61-69;2003.

163

MYOCARDIAL C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PACING-INDUCED HEART FAILURE

S. Del Ry¹, V. Lionetti², M. Maltinti¹, C. Colotti¹, M. Cabiati¹, M. Emdin¹, F. Recchia², D. Giannessi¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy

²Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

Background. C-type natriuretic peptide (CNP), a member of the family of natriuretic peptides, was recently found to be produced in the myocardium, but its cellular source and possible difference between atrium and ventricle production are so far lacking.

Aim. To evaluate, in an experimental model of pacing induced heart failure (HF), plasmatic levels of CNP and cardiac gene and protein expressions.

Methods. Adult male minipigs (n=5) were chronically instrumented with a unipolar pacemaker connected to the anterior left ventricular (LV) wall. HF was induced by rapid pacing (180 beats/min) for 4 weeks. End-stage HF occurred at 24 2 days of pacing when the LV end-diastolic pressure was 25 mmHg. As control, we studied 5 adult male minipigs.

Blood samples were collected (aprotinin and EDTA) at rest (control) and at 10 min, 1, 2, 3 and 4 weeks of pacing stress. At 4 weeks, myocardial samples were collected. Both CNP mRNA and proteins were extracted and measured from a same sample of different cardiac chambers with the method of phenol/guanidine-thiocyanate/chloroform.

CNP levels in plasma and in cardiac extracts were determined by a radioimmunoassay after a preliminary extraction on Sep-Pak C18, while the expression of mRNA coding for CNP in myocardial tissue by RT-PCR. As overall control, a parallel RT-PCR assay for BNP mRNA expression was carried out in the same samples.

Results. Compared to control, plasmatic CNP levels are increased after 10 min of pacing stress (17 ± 5.1 pg/ml vs. 27 ± 6.6 , $p < 0.05$, mean \pm sem). As to myocardial extract, at rest CNP was found in all cardiac chambers and its content was ten fold higher in atria than in ventricles. Conversely, at 4 weeks of pacing stress, myocardial levels of CNP were higher in left ventricle. The expression of mRNA coding for CNP was observed at 4 weeks of pacing although CNP gene expression appears to be noticeable lower than that of BNP.

Conclusion. The high plasmatic levels of CNP found after 10 min of pacing as well as the myocardial CNP expression suggest further investigations on the mechanisms of CNP secretion in a stress-dependent manner.

Reference. Scotland RS et al. CNP in vascular physiology and disease. *Pharm Ther* 2005;105:85-93.

164

DIRECT ASSAY FOR NT-proCNP DETERMINATION: RELATIONSHIP WITH CNP

S. Del Ry¹, M. Maltinti¹, M. Cabiati¹, C. Colotti¹, G. Catapano¹, M. Emdin¹, D. Giannessi¹

¹CNR, Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy

Background. C-type natriuretic peptide (CNP) plays a central role in the control of vascular tone as well as in several clinical conditions characterized by endothelial dysfunction. Recent observations reported that CNP is produced within the failing myocardium and that its levels are increased significantly as a function of the severity of disease, supporting a role for CNP in the pathophysiology of chronic heart failure (CHF).

Due to low circulating of CNP, a pre-analytical phase is necessary to reliably assay plasma CNP concentrations. Amino-terminal C-type natriuretic (NT-proCNP), that has been found elevated in CHF, circulates at higher concentrations than CNP allowing a direct assay and the use of smaller amounts of plasma.

Aim. To evaluate the analytical performance of a direct ELISA for NT-proCNP (Biomedica Gruppe-Pantec) and to compare its plasma levels with those of CNP.

Method. Accuracy, variability and sensitivity of the assay were assessed by specific experiments.

NT-proCNP and CNP plasma levels were simultaneously measured in 37 healthy subjects and in patients with different diseases characterized by endothelial dysfunction, such as CHF (n=99), diabetes (n=21) and cirrhosis (n=14).

Results. Between and within assay variabilities were 15% and 8% respectively and analytical sensitivity was 0.34 ± 0.03 pg/tube. A parallelism of the response was observed from 12.5 to 100 microliters of plasma.

In controls NT-proCNP was 37.4 ± 1.9 pg/ml, mean \pm sem, and higher levels were found in diabetes (51.4 ± 5.2 , $p = ns$), in cirrhosis (106.5 ± 32.3 , $p = 0.001$) and in CHF (68.0 ± 7.5 , $p = 0.02$) where the concentrations increased as a function of the severity. A significant correlation was observed between NT-proCNP and CNP ($r = 0.32$, $p < 0.0001$) considering the patients as a whole.

Conclusion. Although the diagnostic accuracy of this determination have to be evaluated on a larger number of subjects, this assay results more easy to perform of CNP and suitable for reliably detect changes in NT-proCNP plasma levels as a function of different clinical conditions.

Reference. Del Ry S, et al. Radioimmunoassay for plasma CNP determination: a methodological evaluation. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:641-5.

165

STRATEGIE PER L'IMPIEGO OTTIMALE DEI BIOMARCATORI CARDIACI: VERIFICA DELL'EFFICACIA DOPO 6 MESI DI APPLICAZIONER. Dominici¹, A. Dolci¹, C. Valente¹, M. Panteghini¹¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, AO L. Sacco e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano

Dall'ottobre 2005 sono state introdotte nel nostro Ospedale nuove strategie per l'impiego dei marcatori cardiaci (1). Dopo 6 mesi di applicazione, ne abbiamo verificato l'impatto confrontando i periodi ott2005-mar2006 (attivazione dei nuovi protocolli; S2) e ott2004-mar2005 (applicazione dei criteri preesistenti; S1). Il numero totale dei dosaggi eseguiti in urgenza si è ridotto del 34.8% (da 104.748 in S1 a 68.280 in S2). Sono stati azzerati i dosaggi di mioglobina e CKMB attività (richiesti in S1 in n. di 7761 e 9629). AST, CK e LDH, il cui impiego era sconsigliato dalle nuove strategie, hanno mostrato una riduzione delle richieste urgenti del 6.4%, 24% e 16.8%, che non era a discapito di un corrispondente aumento degli stessi esami in regime ordinario. CKMB, disponibile solo come determinazione di massa ed esclusivamente in regime ordinario per specifici protocolli (quantificazione area di necrosi e valutazione danno periprocedurale), è stata eseguita in S2 su 1377 campioni, con un decremento del 84.1% rispetto a S1. Per quanto riguarda troponina (TnT) e NT-proBNP, si sono evidenziate variazioni pari a -1.7% e +25.7%, con un totale di 685 richieste di NT-proBNP in S2. Riguardo al costo-analisi, il risparmio calcolato è stato di 112.116 € su base annua. In merito all'appropriatezza delle richieste, si rilevava una sostanziale aderenza ai protocolli raccomandati, anche se con qualche eccezione (es. un aumento delle richieste di TnT da parte della Cardiocirurgia a fronte della mancanza di evidenze definitive sulla sua utilità nel definire il danno cardiaco perioperatorio). Il protocollo per la quantificazione dell'area di necrosi era appropriatamente eseguito nel 83% dei casi, mentre quello per la definizione del danno periprocedurale era eseguito correttamente solo nel 41% delle volte. In conclusione, un più appropriato uso dei biomarcatori ha determinato un'importante riduzione del numero di analisi eseguite associato ad una significativa compressione della spesa per i reagenti. Questa riduzione non è andata a discapito della qualità assistenziale che, anzi, trova nell'applicazione delle raccomandazioni prodotte un essenziale strumento di miglioramento.

Bibliografia. Panteghini M, Belloni A, Botta M, et al. *Biochim Clin* 2005;29:419.

166

VALUTAZIONE DELL'IMPRECISIONE DEL METODO DI DETERMINAZIONE DELLA TROPONINA T DI 4a GENERAZIONE: RISULTATI DA UN CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNOR. Dominici¹, P. Luraschi¹, A. Dolci¹, M. Panteghini¹¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera L. Sacco, Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano

La diagnosi di infarto del miocardio (IMA) assegna alla determinazione della troponina un ruolo centrale. Il limite decisionale per il suo utilizzo deve garantire la più alta sensibilità per l'identificazione della necrosi miocardica, mantenendo tuttavia un'attendibilità analitica accettabile, definita come CV totale $\leq 10\%$. Questo traguardo analitico garantisce un errore diagnostico $< 1\%$. Ogni laboratorio dovrebbe sistematicamente valutare l'imprecisione del metodo in uso per la determinazione della troponina, a supporto della corretta scelta del livello decisionale. Infatti, i risultati ottenuti dall'impiego quotidiano di un metodo forniscono la stima ottimale della sua imprecisione e possono significativamente differire da quelli del produttore. Recentemente, Roche Diagnostics ha introdotto un test di nuova generazione per la determinazione della troponina T su sistema Elecsys, adattato per l'impiego di campioni di plasma mediante l'introduzione nel reagente di inibitori dell'attività cationica dell'eparina. Al fine di verificare l'imprecisione totale del metodo, erano preparati due lotti di pool di sieri umani a concentrazione vicina al livello decisionale utilizzato (0.03 $\mu\text{g/L}$), aliquotati e conservati a -80°C . Per un periodo di 5 mesi, il pool (prima il lotto 1 e poi il 2) era determinato ogni giorno lavorativo ($n=81$) nel nostro Settore Urgenze. La tabella riporta i risultati ottenuti. La media dei CV mensili (10.2%) dimostrava che, nell'impiego quotidiano, l'imprecisione della nuova versione del test è perfettamente allineata a quella della precedente generazione, permettendo di continuare ad utilizzare come limite decisionale la concentrazione di 0.03 $\mu\text{g/L}$.

	Pool	n	Media, $\mu\text{g/L}$	CV, %
dic 2005	1	8	0.035	11.7
gen 2006	1	18	0.038	7.6
feb 2006	1	15	0.037	9.1
mar 2006	2	22	0.042	11.0
apr 2006	2	18	0.043	11.4

167

HUMAN HEART-TYPE FATTY ACID-BINDING PROTEIN AS AN EARLY MARKER OF MYOCARDIAL DAMAGE AFTER RADIOFREQUENCY ABLATION OF TACHYARRHYTHMIAS.

D. Giannessi¹, A. Rossi¹, M. Maltinti¹, P. Di Cecco¹, L. Panchetti¹, S. Del Ry¹, U. Startari¹, M. Piacenti¹, M. A. Morales¹

¹CNR, Institute of Clinical Physiology, Pisa

Background. Human heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) has been demonstrated to be an early diagnostic and prognostic marker in acute coronary syndromes. Radiofrequency ablation of arrhythmias produces endomyocardial necrosis that may result in release of biochemical markers as a consequence of myocardial cell damage.

Aim. To evaluate the serum levels of this particularly sensible marker in patients undergoing radiofrequency ablation procedure. The clinical validity of H-FABP as a biochemical diagnostic marker in this condition was compared with the known markers of cardiac damage such as Troponin (Tn) I and CK-MB mass. For this, the serum levels of these indices were related with the number and sites, atrial or ventricular, of applications during ablation procedure.

Methods. Blood samples were taken from 11 patients with atrial or ventricular tachyarrhythmias, before and at 0, 3, 6 and 24 hrs after the radiofrequency procedure and the time-course was evaluated by checking for the presence in peripheral circulation of H-FABP (by specific ELISA) as well as of the other markers (by Access II system).

Results. All the biochemical markers significantly increased after ablation with respect to baseline values, but with different time-courses. H-FABP levels increased about three times immediately after the procedure (8.1 ± 2.0 ng/ml vs 3.3 ± 0.6 , mean \pm sem, $p=0.0031$) and returned to baseline at 24 hrs. Increase of H-FABP was particularly relevant after ventricular ablations; in this subset of patients H-FABP was related to number of radiofrequency applications. TnI and CK-MB showed a peak at 3 and 6 hrs after ablation ($p<0.05$ vs baseline) and both remained higher than basal values at 24 hrs.

Conclusions. These data confirm that radiofrequency ablation determines myocardial damage which can be detected by specific markers. H-FABP may have an important role as a early and sensible marker of injury.

Reference. Brueckmann M, Wolpert C, Bertsch T et al. Markers of myocardial damage, tissue healing, and inflammation after radiofrequency catheter ablation of atrial tachyarrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2004;15:686-91.

168

CIRCULATING LEVELS OF ADIPONECTIN INCREASE IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC DILATED CARDIOMYOPATHY WITH AND WITHOUT OVERT HEART FAILURE

D. Giannessi¹, M. Maltinti¹, S. Del Ry¹, A. M. Sironi¹, A. Gastaldelli¹, S. Turchi¹, C. Colotti¹, D. Neglia¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa

Purpose. Adiponectin, a biologically active substance released by adipose tissue, is thought to have a protective effect on vascular atherosclerosis by inhibiting vascular inflammation. A high adiponectin level appears to be a predictor of mortality in patients with heart failure and it has been found significantly increased in damaged cardiomyocytes from patients died for idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM). Aim of this study was to assess the peripheral levels of adiponectin, as compared with leptin, in patients with DCM, with and without heart failure, and to evaluate its relationship with inflammatory profile and left ventricular (LV) function.

Methods. Plasma adiponectin and leptin were evaluated in 77 no diabetic patients with DCM (37 males, 65 in NYHA class I-II, 12 in NYHA class III, LVEF% 40.6 ± 1.4 , age 57 ± 1 yrs, BMI 26.6 ± 0.41 Kg/m², mean \pm sem) and in 40 age- and BMI-matched healthy subjects as control, by specific Elisa.

Results. Adiponectin was 6.5 ± 0.41 ng/ml in controls and significantly increased in DCM patients (12.2 ± 0.82 , $p<0.001$) as a function of the disease severity: 11.4 ± 0.78 and 16.7 ± 2.8 ng/ml in NYHA class I-II vs class III ($p=0.023$). A negative correlation with LVEF% ($p=0.049$) was found. Adiponectin positively correlated with Interleukin-6 ($p<0.001$) and BNP ($p=0.0005$) while no correlation with BMI was found. Leptin was 9.1 ± 1.5 ng/ml in controls and unchanged in DCM (8.9 ± 0.8 ng/ml) irrespective of the severity of disease. A significant positive correlation was found between leptin and BMI ($r=0.41$, $p=0.0003$), while no relationship was found between this effector and the markers of inflammation and myocardial function.

Conclusions. This is the first study which demonstrates a significant increase of adiponectin levels in DCM patients with or without overt heart failure. These results as well as the relationship with markers of inflammation and of cardiac dysfunction, suggest a role for this effector in the processes of myocardial injury occurring in this disease.

Reference. Kistorp C, Faber J, Galatius S et al. Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005;112:1756-62.

169

UNA RIVALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DELLA TROPONINA I DETERMINATA SU DIMENSIONÄ RXL MAXC. Lo Cascio¹, C. Cocco¹, N. Zanella¹, M. Bertolani¹, P. Perfetti², F. Praticò², W. Mantovani³, P. Rizzotti¹¹U.O. Lab. Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, OCM, Az. Osp. Verona²U.O. Pronto Soccorso, OCM, Az. Osp. Verona³D.M.S.P. Università di Verona

Scopo. Nell'ambito di uno studio su marcatori in grado di stratificare il rischio per eventi cardiovascolari in pazienti afferenti al pronto soccorso con sintomatologia suggestiva di sindrome coronarica acuta (SCA), abbiamo rivalutato le caratteristiche di sensibilità e specificità della troponina I (TnI) da noi utilizzata.

Metodi. Sono stati esaminati i dati di 314 pazienti in un arco temporale di 8 mesi, selezionati come fortemente sospetti per SCA. Nell'analisi sono stati considerati i valori di TnI ottenuti a 6-12 ore dall'inizio del dolore toracico e le prestazioni sono state valutate sulla base del riscontro di infarto miocardico acuto nella diagnosi di dimissione.

La determinazione della TnI è stata effettuata con analizzatore Dimension RxL Max (Dade Behring) con metodica dedicata.

Risultati. Come illustrato in tabella, sono state valutate le prestazioni di sensibilità, specificità e valore predittivo a diversi cut off decisionali: 0.04 µg/L, la sensibilità dichiarata dalla ditta produttrice; 0.25 µg/L, il cut off utilizzato nella refertazione che corrisponde ad un CV analitico del 10%; 0.16 µg/L, che emerge dai dati come il valore che mantiene la specificità prossima al 100% ed aumenta la sensibilità rispetto al valore di 0.25 µg/L.

Conclusioni. Dall'analisi dei dati appare come, in una popolazione fortemente selezionata, un valore di 0.16 µg/L potrebbe essere considerato una soglia di allarme.

Bibliografia. Panteghini M et al. Evaluation of imprecision for cardiac Troponin assays at low range concentrations. Clin Chem 2004;50:327-332

	Valore decisionale		
	0.04 µg/L	0.16 µg/L	0.25 µg/L
Sensibilità	88,4	58,1	48,8
Specificità	82,3	99,6	100
Valore predittivo pos	44,2	96,1	100
Valore predittivo negativo	98,8	93,8	92,5

170

FETUIN-A AND OTHER RISK FACTORS OF CARDIAC CALCIFICATIONS IN HEMODIALYSIS PATIENTSR. Massarelli¹, P. D'Aiuto¹, S. De Angelis², A. Noce², V. Luciani¹, P. Casalino¹, S. Casciani¹, I. Giambini¹, G. Coen², G. Federici¹, M. Dessì¹¹Laboratory Medicine, University Hospital "Tor Vergata" Rome, Italy²Nephrology and Dialysis, University Hospital "Tor Vergata" Rome, Italy

Cardiac calcifications are a frequent finding in uremic patients and probably responsible of fatal heart events. Low levels of AHSR protein (Fetuin-A), an acute negative reactive protein synthesized in the liver, have been considered as a risk factor of cardiac death in dialysis patients. The calcifications in the vascular tissue are the result of an active local process whereby the phenotype of smooth muscle cells differentiates into osteoblast-like cells. Other factors, as Fetuin-A, counteract the vascular calcification process through solubilization of calcium salt. Fetuin-A levels in HD patients are lower than normal. This study has been carried out in order to evaluate the risk factors of cardiac calcifications and the role of Fetuin-A levels in hemodialysis patients (HD). 120 patients on maintenance hemodialysis, age 59.1±13.1 years, HD age 63.5±61.8 months, M/F 77/43, were submitted to evaluation of a cardiac calcification score with fast Multilayer Computerized Tomography (MCT). Moreover calcium phosphate metabolism, lipid and inflammatory parameters, among which PINI index, Fetuin-A and PCR were measured as well as hemoglobin concentration. More than 80% patients had frankly pathologic Score values. Fetuin-A was much lower than normal (0.328±0.11 g/L; NV 0.519±0.15 g/L). Multi-regression analysis (MRA) showed selected age (p<0.0001), serum Cholesterol (<0.0001), Calcium (<0.003), Triglycerides (<0.033) and HDL (<0.059) as variables predictive of log calcium Score, while Fetuin-A was excluded. In addition the coronary calcium Score was correlated to calcitriol IV administration (p<0.001). Pre-albumin was correlated to Fetuin-A in the MRA, while CPR and PINI index were among the excluded variables. In addition Fetuin-A was predictive of Hb concentration and seem to be linked to inflammatory and nutritional parameters known to affect Hb concentration and atherogenesis. Fetuin-A, as a cause of cardiac disease does not seem to act through enhancement of arterial calcifications. Fetuin-A could be involved in the process of calcification both in the case of markedly low serum levels also as a marker of inflammation.

Reference. Coen G. et al ASAIO J 2006;52(2):150-6

171

CARATTERISTICHE ANALITICHE E PRESTAZIONI CLINICHE DEL NUOVO PANNELLO BIOCHIMICO EVIDENCE CARDIAC PANEL

M. M. Mion¹, M. Zaninotto¹, E. Novello¹, S. Altinier¹, S. Rocco², F. Tosato², L. Cacciavillani³, M. Perazzolo Marra³, S. Iliceto³, M. Plebani¹

¹Dip. di Med. di Lab., Az. Osp. di Padova, Padova

²Dip. di Emergenza, Az. Osp. di Padova, Padova

³Dip. di Scienze Cardiache, Toraciche e Vascolari, Università di Padova, Padova

E' stato valutato il nuovo pannello biochimico evidence Cardiac Panel (RANDOX Laboratories) che consente la determinazione quantitativa ed automatizzata di: mioglobina (MYO), troponina cardiaca I (Tnl), creatina chinasi-MB (CK-MB), anidraasi carbonica III (CAIII), isoforma cardiaca della proteina legante gli acidi grassi (H-FABP), glicogeno fosforilasi BB (GPBB). Le concentrazioni ($\mu\text{g/L}$) sono state determinate su siero. Cut-off dell'analita=99° percentile dei valori in un gruppo di riferimento (dati del produttore). Imprecisione. Sono stati utilizzati 3 livelli di controllo (QC) e 2 pools (P). Intervalli di concentrazioni medie e di CV% rispettivamente. QC: MYO=98.92-293.36, 5.36-5.69; Tnl=1.53-7.80, 6.02-9.80; CK-MB=3.44-33.21, 6.80-9.01; CAIII=2.82-67.47, 6.98-10.99; H-FABP=2.32-44.03, 6.26-8.04; GPBB=12.42-140.75, 6.51-8.61. P: MYO=52.48-339.64, 7.39-16.50; Tnl=2.84-8.54, 7.75-9.37; CK-MB=2.38-16.10, 8.82-10.08; CAIII=31.75, 13.61; H-FABP=11.85-64.77, 9.03-12.63; GPBB=7.34-21.52, 9.39-12.12. Effetto matrice. Sono state confrontate le concentrazioni ottenute su campioni di siero e plasma (litio-eparina). Bias (95% CI): MYO=+5.194 (+1.952/+8.435), Tnl=-0.559 (-0.893/-0.224), CK-MB=+0.042 (-0.400/+0.484), CAIII=-9.719 (-20.179/+0.742), H-FABP=-0.178 (-0.389/+0.033), GPBB=+1.307 (-0.948/+3.561). Confronto tra metodi. MYO e Tnl sono state determinate con evidence (E) e con Dimension RxL (D) (Dade-Behring). E-MYO=0.710 D-MYO+7.808 ($r=0.988$); E-Tnl=0.542 D-Tnl+0.822 ($r=0.917$). Bias (95% CI): MYO=-29.217 (-40.255/-18.179); Tnl=-2.749 (-4.039/-1.460). Studio clinico. Dal 3-10 al 8-12-2005, 23 pazienti (20M+3F, 37-85 anni) sono stati ricoverati presso il reparto di cardiologia (diagnosi di dimissione: angina instabile n=3; infarto miocardico acuto, IMA n=20). Dei 17 pazienti con D-Tnl>cut-off (0.15) al primo prelievo, 5 presentavano una E-Tnl<cut-off. In questi 5 pazienti con D-Tnl>cut-off e E-Tnl<cut-off, la H-FABP era>cut-off in 5, la MYO in 4, la CK-MB in 2, la GPBB in 1. Tutti i 6 pazienti con D-Tnl<0.15 presentavano una E-Tnl<cut-off, mentre la H-FABP era>cut-off in 3, la GPBB in 2, la MYO in 1. La H-FABP era>cut-off in tutti i pazienti con IMA. La strategia multi-markers migliora il corretto inquadramento del paziente con sindrome coronarica acuta.

172

PROGNOSTIC RELEVANCE OF SERUM N-TERMINAL PRO NATRIURETIC PEPTIDE TYPE B AND CARDIAC TROPONIN I IN PATIENTS WITH AL AMYLOIDOSIS

M. Nuvolone¹, G. Palladini¹, P. Russo¹, F. Lavatelli¹, S. Casarini¹, S. Perlini², F. Clari², R. Albertini³, G. Vadacca³, L. Obici¹, G. V. Melzi D'Eril⁴, R. Moratti³, G. Merlini¹

¹Cento per l'Amiloidosi e Lab. di Biotecnologie, IRCCS San Matteo e Università di Pavia

²Dip. di Medicina Interna, IRCCS San Matteo e Università di Pavia

³Lab. di Chimica Clinica, IRCCS San Matteo e Università di Pavia

⁴Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università di Milano

In light chain amyloidosis (AL), cardiac dysfunction assessed by N-terminal pro natriuretic peptide type B (NT-proBNP) and troponin I (Tnl) strongly affect prognosis. A staging system based on the serum concentration of these markers was proposed by the Mayo Clinic Group in a retrospective series (J Clin Oncol 2004;22:3751-7). In the present study we prospectively evaluate the prognostic significance of NT-proBNP and cTnl in AL.

Serum NT-proBNP and cTnl concentrations were measured in 150 consecutive AL patients (median age 62 y, range 28-91 y, 79 males), enrolled between February and June 2005. Patients in dialysis or with atrial fibrillation were excluded. NT-proBNP was measured with an electrochemiluminescence sandwich immunoassay (ECLIA, Roche) on Elecsys System 2010. Tnl concentration was measured with a chemiluminescence assay (Beckmann Access). The patients were divided into 3 groups according to the prognostic cutoffs proposed by the Mayo Clinic: 332 ng/L for NT-proBNP and 0.1 ng/mL for cTnl. Group 1 comprised patients (43, 29%) with normal NT-proBNP and cTnl, group 2 patients (77, 51%) with only one marker above the cutoff and group 3 patients (30, 20%) with both markers above the cutoffs. Differences in survival were tested for significance with the log-rank test.

No patient with cTnl above the cutoff had a normal NT-proBNP. Median (range) concentrations of NT-proBNP and cTnl were 1147 ng/L (16-42749 ng/L) and 0.03 ng/mL (0-0.92 ng/mL), respectively. The median follow-up of living patients is 13 months and 31 patients died. No patient in group 1, 17 patients (22%) in group 2 and 14 (47%) in group 3 died. The differences in survival between groups 1 and 2 ($p=.0008$), 2 and 3 ($p=.01$) and 1 and 3 ($p<.0001$) were statistically significant. Median survival was not reached in groups 1 and 2 and was 12.7 months in group 3.

The prognostic relevance of NT-proBNP and cTnl is confirmed in a prospective setting. A high concentration of cTnl identifies patients with advanced disease who are at risk of early death. The staging system based on these 2 markers allows an accurate prognostic stratification that may prove useful in adapting the therapeutic strategy to the patients' risk and in comparing the results of therapeutic trials performed at different centers.

173

PROGNOSTIC RELEVANCE OF SERUM N-TERMINAL PRO NATRIURETIC PEPTIDE TYPE B AND PLASMA BNP IN PATIENTS WITH AL AMYLOIDOSIS IN DIALYSIS

M. Nuvolone¹, G. Palladini¹, P. Russo¹, F. Lavatelli¹, S. Perlini², F. Clari², S. Casarini¹, R. Albertini³, G. Vadacca³, L. Obici¹, G. V. Melzi D'Eril⁴, R. Moratti³, G. Merlini¹

¹Centro per l'Amiloidosi, IRCCS San Matteo e Università di Pavia

²Dip. di Medicina Interna, IRCCS San Matteo e Università di Pavia

³Lab. di Chimica Clinica, IRCCS San Matteo e Università di Pavia

⁴Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università di Milano

In light-chain amyloidosis (AL) heart dysfunction assessed by N-terminal natriuretic peptide type B (NT-proBNP) determines prognosis (Circulation 2003;107:2440-5). NT-proBNP clearance relies on glomerular filtration and its concentration increases in dialysis. Natriuretic peptide type B (BNP) is also degraded via clearance receptors. Renal involvement is common in AL and 15% of patients eventually require dialysis. We assessed the prognostic value of the 2 markers in AL patients in dialysis.

Serum NT-proBNP was measured by an electrochemiluminescence sandwich immunoassay (ECLIA, Roche). Upper reference limits (u.r.l.) in men and women are respectively 88 ng/L and 153 ng/L in individuals <50 y old and 227 ng/L and 334 ng/L in individuals >50 y old. Plasma BNP was measured by a 2 site immunochemiluminescent assay (ADVIA Centaur, Bayer). The u.r.l. is 50 ng/L. Quality control was ensured by assaying 3 levels of a control sample in each series and participating in a national control program (Cardiormo-Check, CNR, Pisa). Sampling was performed 24h after hemodialysis. Differences in concentration were tested by the Mann-Whitney U test. Effects on survival were estimated by univariate Cox models.

NT-proBNP and BNP were measured in 36 consecutive patients in dialysis (median age 62 y, range 33-81 y, 18 males, 34 hemodialysis, 2 peritoneal dialysis), between February 2004 and March 2006. Median (range) NT-proBNP and BNP were 10124 ng/L (296-153900 ng/L) and 292 ng/L (4-7246 ng/L), respectively. Twenty-four patients (67%) had heart involvement. They had higher BNP than other patients (median 761 vs. 149 ng/L, p=.02). NT-proBNP was higher, though not significantly, in cardiac amyloidosis (median 15227 vs. 2642 ng/L, p=.06). Eleven patients (31%) died (median survival not reached). Median follow-up of living patients is 13 months. NT-proBNP (p=.024) and BNP (p=.023) predicted survival.

Median NT-proBNP and BNP concentrations in AL patients in dialysis are higher than that of AL patients with preserved renal function (NT-proBNP 1147 vs. 10124 ng/L, p<.0001; BNP 117 vs. 292 ng/L, p=.002; in 150 patients, 74% with cardiac involvement). BNP discriminates better than NT-proBNP between patients with and without cardiac involvement in dialysis. Both markers predict survival.

174

COMPARISON OF PREVALENCE OF ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION (AMI) APPLYING THE IFCC RECOMMENDATION FOR SAMPLING PROTOCOL AND THE 2003 AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA) CASE DEFINITION

F. Pagani¹, G. Bonetti¹, M. Panteghini²

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. Spedali Civili, Brescia

²Dip. di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi di Milano

The aim of the study was to compare the prevalence of AMI by applying the IFCC recommendation for sampling protocol in which the biochemical marker, i.e. cardiac troponin, should be measured at the hospital admission, and after 6 and 12 h (1) and the 2003 AHA case definition statement, requiring an "adequate set" of measurements defined as two determinations of the same marker at least 6 h apart (2). The study population was 185 consecutive patients admitted to Coronary Care Unit with symptoms of cardiac ischemia but without ST elevation at the ECG. Blood samples were obtained according to our routine diagnostic protocol applying the IFCC recommendations. Cardiac troponin T (cTnT) was measured in serum using the Elecsys 2010 (Roche Diagnostics). AMI was diagnosed if at least one of samples had cTnT above the selected cut-off (0.03 µg/L, i.e. the cTnT concentration associated with a 10% total CV) and the trend of marker increase was typical. We calculated the prevalence of AMI in study population using the IFCC sampling protocol (3 samples) and the 2003 AHA protocol (2 samples). Furthermore, we compare the use of two cut-off for AMI diagnosis: the above mentioned 10% CV cut-off and the 99th percentile limit of the reference distribution, as suggested by European Society of Cardiology/American College of Cardiology (3) (for cTnT, 0.01 µg/L). The results are illustrated in the table.

In our population, the use of a shorter sampling protocol, as suggested in 2003 AHA case definition, will lead to approximately 5% decrease in the number of AMI patients identified, who become positive only at 3rd sample, independently of the selected cut-off.

	Calculated prevalence of AMI in the study population			
	IFCC protocol		2003 AHA statement	
	cTnT cut-off 10% CV	cTnT cut-off 99 th percentile	cTnT cut-off 10% CV	cTnT cut-off 99 th percentile
All samples ≤cut-off (AMI negative)	64	40	71	46
3 rd sample >cut-off (AMI positive)	7	6	-	-
2 nd sample >cut-off (AMI positive)	42	40	42	40
1 st sample >cut-off (AMI positive)	72	99	72	99

1. Clin Chem Lab Med 1999; 37:687-93. 2. Circulation 2003;108:2543-2549.
3. J Am Coll Cardiol 2000;36:959-969.

175

RESULTS FROM A MULTICENTER EVALUATION OF THE 4th GENERATION ELECSYS® TROPONIN T ASSAY

F. Pagani¹, F. Apple², L. Garcia-Beltran³, D. Hermsen⁴, A. Jaffe⁵, B. Karon⁵, E. Lewandowski⁶, A. Muhlbacher⁷, R. Muller⁸, J. Ordenez⁹, T. Plecko¹⁰, J. Jarausch¹¹, M. Panteghini¹²

¹ *Spedali Civili, Brescia, Italy*

² *Dept. of Laboratory Medicine and Pathology, Hennepin County Medical Center, Minneapolis, MN*

³ *Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain*

⁴ *Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany*

⁵ *Mayo Clinic, Rochester, NY*

⁶ *Mass. General Hospital, Boston, MA*

⁷ *Landesklinik Blutgruppen Serologie und Transfusionsmedizin, Salzburg, Austria*

⁸ *Institute of Clinical Chemistry, Universitätsklinikum Aachen, Germany*

⁹ *Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain*

¹⁰ *Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum Stuttgart, Germany*

¹¹ *Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany*

¹² *Università degli Studi, Milano, Italy*

This multicenter study evaluated the performance of an improved Elecsys Troponin T (cTnT) immunoassay with a special focus on the serum to heparin-plasma comparability. The evaluation was performed in 10 laboratories according to a standardized protocol (Roche Diagnostics, study no. B05P008). The cTnT assay was performed on Modular E170 and Elecsys 2010 systems. The cTnI immunoassays (Vidas® Biomerieux; Dimension® Dade Behring; Immulite® 2000 DPC) were performed according to the manufacturer's instructions. Intraassay (n=21) and interassay (2 runs/d, 10d, triplicate measurements) imprecisions were evaluated using two commercial controls and 6 serum pools (cTnT, 0.014 to 4.102 µg/L). Intraassay CVs ranged from 0.7% to 3.2%. Interassay CVs ranged from 3.6% to 35.4% (cTnT <0.10 µg/L) and 1.8% to 9.1% (cTnT >0.10 µg/L), respectively. The cutoff for myocardial necrosis was determined to be 0.028 µg/L using the 10% interassay CV criteria. Linearity was assessed by serial dilutions of 5 serum samples using cTnT negative pools. Linearity was proven up to 21.3 µg/L (recoveries: 90-110%). The comparison between the 4th generation and the commercially available cTnT assay showed highly similar results across the whole measuring range: $y=1.02x-0.001$, $r=0.998$; $n=988$. Using the commercial cTnT reagent, the serum to heparin-plasma comparison yielded a systematic bias to ~10% lower cTnT results in heparin-plasma. Suitable comparability was obtained using the 4th generation assay. The regression analysis (serum vs. heparin) across the studied range (0.01 to 16 µg/L) yielded the following equation: $y=0.993x-0.001$; $r=0.986$; $n=441$. The regression data were comparable to the serum/heparin-plasma comparability of the studied cTnI immunoassays

(slopes: 0.939-1.241; intercepts: 0.015-0.054, r : 0.981-0.998, n : 33-49). However, individual serum to matched heparin-plasma samples still yielded poor comparability (bias >20%) using the 4th generation cTnT as well as cTnI assays. Our data show an excellent analytical performance of the improved cTnT immunoassay, with no systematic bias between serum and heparin-plasma cTnT results. Further studies are necessary to investigate the cause of poor comparability of troponin results in rare individual serum to matched heparin-plasma samples.

176

EVALUATION OF PLASMA BNP LEVELS IN PATIENTS WITH CONGENITAL HEART DISEASES

M. S. Parri¹, M. Cantinotti², S. Storti¹, E. Battipaglia¹, A. Andrenelli¹, E. Bonomi¹, A. Lunardini², V. De Lucia², S. Giusti², A. Clerico¹

¹Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Ospedale "G.Pasquinucci", Massa

²Unità Operativa di Cardiologia Pediatrica, Ospedale "G.Pasquinucci", Massa

Aim. We evaluated BNP levels in pediatric patients with congenital heart diseases presenting different hemodynamic setting.

Methods. BNP was measured by AxSYM (Abbott Laboratories) in 110 consecutive patients (median age 4.2 years, range 0.02-44 years) with left ventricular (LV) volume overload (ventricular septal defect, VSD, patent ductus arteriosus, PDA, mitral insufficiency, MI), right ventricle (RV) volume overload (atrial septal defect, ASD), LV pressure overload (coarctation of the aorta, CoA and aortic stenosis, AS), RV pressure overload (unrepaired tetralogy of Fallot, TOF, pulmonary stenosis, PS, unrepaired transposition of great arteries, TGA, palliated functionally univentricular heart, UH).

Results. In LV volume overload, BNP values were significantly increased (mean value and range, ng/L: VSD 964.8, 37.0-4012; PDA 775.7, 8.1-4012.3; MI 353.7, 61.9-628.2). In RV pressure overload, BNP values were increased (mean value and range in ng/L: UH 505.7, 18.1-3692.0, TGA 387.2, 18.8-1095.7). In patients with LV pressure overload, BNP values were increased above the normal range, but lower than those found in LV volume overload (mean value and range: CoA 145.9 ng/L, 0.5-670.4 ng/L; AS 301.4, 36.7-838.4 ng/L). In CoA no correlation exists between BNP values and the gradient across the coarctation (estimated using Doppler echocardiography). An increment in BNP values lower than in LV overload (mean ASD 114.2 ng/L, range 5.1-838.7 ng/L) was observed in right ventricular (RV) volume overload. In TOF and PS patients, BNP values were normal or borderline (mean value and range: TOF 49.0 ng/L, 6.7-273.0 ng/L; PS 49.2 ng/L, 16.0-72.2 ng/L). Finally, no significant correlation was found between systolic RV pressure (estimated using Doppler echocardiography of tricuspid regurgitation) and BNP values.

Conclusions. A wide range of values of BNP can be found in patients with congenital heart diseases. In right RV pressure overload BNP value was normal or borderline and there was no correlation with systolic right ventricle pressure. There was a moderate increase with palliated univentricular heart, TGA, LV pressure overload and right ventricle volume overload. The greatest elevation in BNP values was seen in LV volume overload.

177

B-TYPE PLASMA NATRIURETIC HORMONE LEVEL IN OPERATED FALLOT PATIENTS

C. Prontera¹, P. Festa¹, L. Ait-Ali², D. De Marchi¹, M. Emdin¹, A. Clerico², S. Turchi¹, G. C. Zucchelli¹, C. Passino¹

¹Institute of Clinical Physiology, CNR Pisa and Massa

²Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

Background and Objectives. Survivors of tetralogy of Fallot (TOF) repair are an increasing population. However, right ventricular (RV) overload may occur due to outflow tract and pulmonary pathway anomalies. Plasma concentration of B-type natriuretic hormones is an accurate marker of cardiac dysfunction. Aim of the present study was to evaluate the relationship between plasma concentration of NT-proBNP, functional capacity and right ventricular (RV) overload in operated TOF patients.

Methods. We prospectively studied 70 operated symptomless TOF patients (45 males, 21±1 years, mean±SEM) who underwent, within the same day, echocardiography, cardiac magnetic resonance imaging, neurohormonal characterisation (plasma NT-proBNP, catecholamines, plasma renin activity and aldosterone assay), and cardiopulmonary exercise testing. Forty-eight age and sex-matched healthy volunteers served as control group.

Results. As compared to controls, maximal workload and peak oxygen consumption (VO₂/Kg) were lower in operated TOF patients (99±4 vs 159±7 Watts and 18.4±1.6 vs 30.0±1.5 ml/min/kg, respectively, p<0.001), while NT-proBNP concentration was elevated (218±28 vs 39±3 ng/L, p<0.001). No difference was found among the other neurohormones. In operated TOF patients, NT-proBNP showed a significant negative correlation with peak VO₂/kg (R=0.57, p<0.001) and a positive correlation with RV end-systolic (R=0.45, p<0.001), end-diastolic volumes (R=0.40, p<0.001), RV ejection fraction (R=0.32, p<0.01) and RV systolic pressure (R=0.27, p<0.05). From multivariable analysis NT-proBNP concentration resulted as independent predictor of peak VO₂/kg, RV end-systolic volume and RV systolic pressure.

Conclusions. These results show an association among RV overload, decrease in functional capacity and cardiac natriuretic peptide expression in operated TOF patients. Therefore, NT-proBNP plasma assay might be a useful tool for diagnostic purposes and for decision making in this setting.

178

EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEME FOR BNP AND NT-proBNP ASSAYS: PRELIMINARY RESULTSC. Prontera¹, M. Zaninotto², A. Clerico¹, A. Pilo¹, M. Plebani², L. Sciacovelli³, G. C. Zucchelli¹¹CNR, Istituto di Fisiologia Clinica Pisa, Italy²Dipartimento di Medicina di laboratorio Policlinico Ospedale-Università, Padova, Italy³Centro di Ricerca Biomedica Castelfranco Veneto, Italy

In order to evaluate the analytical performance of BNP and NT-proBNP measurements, an External Quality Assessment (EQA) scheme (CardioOrmocheck) have been organized and carried out in Italy. During 2005, 80 laboratories assayed 8 control samples at different concentrations (prepared from residual of plasma-EDTA routine analysis). Statistics of the collected results were computed and circulated sending back to the participants periodic and cumulative reports. The methods most used by the laboratories were for BNP: Centaur Bayer (15 labs), TRIAGE Biosite (12 labs), Access Beckman (8 labs), AxSYM Abbott (7 labs); for NT-proBNP: Elecsys Roche (24 labs), Dimension Dade-Behring (6 labs), Modular Roche (5 labs). For each control sample, the mean values of BNP and NT-proBNP obtained by the different method and the imprecision (within-method, between-laboratory CV%) are reported in tables.

These preliminary results confirm that BNP assays are affected by large systematic differences between-method while the agreement of the NT-proBNP measurements is much better even if the performance of Dimension method has been carried out in a sample matrix (plasma-EDTA) not recommended by manufacturer.

BNP Sample	Centaur		Biosite		Access		Axsym	
	ng/L	CV%	ng/L	CV%	ng/L	CV%	ng/L	CV%
CO51a	3.9	24.9	6.8	14.9	9.1	10.1	5.1	55.6
CO54a	6.9	37.4	28.3	18.0	25.9	7.9	15.6	38.8
CO52a	10.8	15.6	31.4	28.2	32.9	12.6	19.8	33.9
CO53a	21.1	10.7	45.0	15.6	53.3	5.8	36.2	24.4
CO51b	33.7	9.4	91.0	14.3	88.9	7.7	45.4	25.6
CO51b	113	4.4	217	15.3	255	5.9	227	8.1
CO52b	175	8.4	284	11.1	316	8.9	276	17.7
CO54b	96.0	8.4	359	19.6	442	3.6	197	14.7
NT-proBNP Sample	Elecsys		Modular		Dimension			
	ng/L	CV%	ng/L	CV%	ng/L	CV%		
CO51a	55.7	12.6	56.3	6.3	189	21.0		
CO54a	378	4.9	360	12.5	527	10.3		
CO52a	378	9.7	363	3.6	677	23.2		
CO53a	780	7.2	737	3.9	1079	4.1		
CO51b	1418	6.1	1335	1.9	1996	9.5		
CO51b	3903	4.6	3827	7.0	4772	8.7		
CO52b	4175	5.3	4151	2.0	5555	12.8		
CO54b	12333	6.2	12294	7.7	12248	6.4		

179

HOMOCYSTEINE AND MTHFR GENE POLIMORPHISMS IN PATIENTS WITH VENOUS TROMBOEMBOLIC DISEASEC. Scazzone¹, E. Lio¹, A. Caruso¹, F. Asaro¹, L. Ferraro¹, C. Bellia¹, S. Cammarieri¹, G. Mingoia¹, M. Ciaccio¹¹Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction. Abnormal plasma tHcy concentrations can result from genetic defects, abnormal vitamin nutritional status, or both. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) plays a key role in Hcy metabolism. A 677C→T mutation identified in the MTHFR gene was found to be frequently associated with decreased MTHFR activity and an elevated plasma homocysteine concentration.

Recently. Hyperhomocysteinaemia (tHcy >11 μmol/L) has been associated with venous thrombosis. The present study aimed to analyze both mutations of the MTHFR gene (C677T and A1298C) and plasma homocysteine levels in subjects with venous thromboembolic disease (VTD) (1).

Materials and Methods. The present study groups comprised 66 patients with VTD (age 24-76; ♀=32, ♂=34) and 28 healthy subjects (age 25-65; ♀=17, ♂=11).

Total genomic DNA was extracted from whole human blood by salting-out procedure. DNA sample were amplified by a polymerase chain reaction. The detection of the C677T in the MTHFR gene was investigated by the restriction enzyme Hinf I. A similar protocol was used to analyze the A1298C by using the restriction enzyme MbolI. The restriction fragments were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel.

Results. Total homocysteine levels were significantly higher in homozygotes for the MTHFR mutation (TT) and in heterozygotes (CT) in patients with VTD (22.2±21.3 versus 14.4 ±9.2 μmol/L, respectively) than in control subjects (10.2±4.5 versus 9.6±3.2 μmol/L, respectively). While, tHcy concentrations were not significantly different in patients with the 1298CC or 1298AC genotypes in both the VTD group and the controls group.

Discussion. These results suggest that homocysteine levels were not significantly increased in subjects carriers the 1298A→C mutation, but homocysteine was elevated (p<0.05) in patients with VTD who were homozygous (TT) for the 677C→T polymorphism. In conclusion, the polymorphism 677C→T of MTHFR and fasting plasma homocysteine levels could be a significant risk factor for venous thromboembolic disease.

References. A.C. Pereira., et al., (2004) Clin. Chim. Acta 340:99-105.

180

ANALYTICAL PERFORMANCE OF CARDIAC TROPONIN-I ASSAYS FOR THE AXSYM PLATFORM: COMPARISON WITH THE OLD METHOD AND ACCESS SYSTEM

S. Storti¹, C. Prontera², M. S. Parri¹, A. Iervasi², S. Vittorini¹, G. Fontani¹, I. Giannelli¹, M. Endim², G. C. Zucchelli², G. Longombardo⁴, P. Migliorini⁴, A. Clerico³

¹Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Ospedale "G. Pasquinucci", Massa

²Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa

³Scuola Superiore S. Anna, Pisa

⁴Dipartimento di Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa

Aim. The determination of cardiac troponins (cTnI) 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 troponin I (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 assays called old (OLD AxSYM) and advanced TnI (ADV AxSYM) methods and with Access system.

Results. An improvement in analytical sensitivity (detection limit) was observed for the advanced cTnI AxSYM compared to the previous method (0.014 vs 0.31 $\mu\text{g/L}$); while the cTnI value for the 10 % CV (i.e., functional sensitivity) was 0.41 $\mu\text{g/L}$ for the ADV and 1.9 $\mu\text{g/L}$ for the OLD method. The kinetics of cTnI release was similar, as evaluated in 25 patients with typical AMI. A close linear relationship was found between the two methods on AxSYM system (old cTnI = $7.436 + 6.858 \text{ Adv cTnI}$; $R=0.968$, $n=214$) and the Access (OLD AxSYM = $7.154 + 7.9 \text{ ACCESS}$, $R=0.876$, $n=158$, ADV AxSYM = $0.23 + 1.209 \text{ Access}$, $R=0.927$, $n=160$). However, a wide bias was found between the OLD and ADV AxSYM methods (mean difference = 118.4 $\mu\text{g/L}$, $p < 0.0001$), as well as between ADV AxSYM and Access method (mean difference 2.6 $\mu\text{g/L}$, corresponding to a mean percent difference of 17 %, $p < 0.0001$). In 106 patients with symptomatic rheumatoid arthritis with high rheumatoid factor (RF) concentration, the mean cTnI measured by ADV AxSYM method was $0.009 \pm 0.031 \mu\text{g/L}$ (range 0-0.23 $\mu\text{g/L}$) with a significant correlation ($R=0.316$, $p=0.001$) between cTnI and RF values. Furthermore, in 60 of these serum samples the cTnI concentration was also measured by Access method with a significant correlation with the values found by ADV AxSYM method ($R=0.468$, $p=0.0002$).

Conclusions. The present study indicates that the AxSYM Troponin-I ADV immunoassay shows improved analytical sensitivity compared to the OLD AxSYM method, as well as very similar clinical results compared to those of Access method.

181

PROTEOMIC ANALYSIS OF CLASSIC KAPOSI SARCOMA

M. A. Cuccuru¹, F. Carta², C. Pirodda¹, F. Turrini², F. Cottoni¹

¹Inst of Dermatology, U. of Sassari, Italy

²Dept of Genetic, Biology and Medical Chemistry, Sect of Medical Chemistry, U. of Torino, Italy

A proteomic investigation has been done on skin biopsies obtained from 8 patients affected by classic Kaposi's sarcoma (K.S.). Proteins extracted from the samples were separated by two-dimensional electrophoresis, and the proteins corresponding to the 95 most intense spots have been identified with mass spectrometry (MALDI-ToF). 18 out of 95 proteins identified belong to the family of stress proteins: among these are heat shock protein 27 (HSP27), HSP60, HSP70, protein disulfide isomerase (ER60), 58 kDa glucose-regulated protein (GRP58), chaperonin containing TCP1, chaperone HSPA5 precursor, BIP protein, peroxiredoxin 3, manganese superoxide dismutase. It is thought that HSPs may contribute to tumours development through a block of apoptotic processes: high expression of these proteins has been observed in several tumors. The abundant presence of stress proteins in the lesional tissues of the patients affected by cKS suggests a possible involvement of these proteins in the pathogenesis of the disease. In addition an overexpression of GRP58 and a downexpression of prohibitin has been correlated with the aggressiveness of the disease. In this scenario proteomic analysis may give a strong support not only to the investigation of mechanisms involved in the pathogenesis of cKS, but also to the detection of specific markers of the disease and possibly of targets for new drugs.

182

APPROPRIATEZZA DELLE RICHIESTE DI PSA LIBERO IN UN SERVIZIO DI MEDICINA DI LABORATORIO OSPEDALIERO

A. Dolci¹, L. Scapellato¹, M. Panteghini¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera L. Sacco, e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano

La determinazione della frazione libera dell'antigene prostatico specifico (fPSA) è specificamente indicata nella diagnosi differenziale tra iperplasia prostatica benigna ed adenocarcinoma prostatico, qualora la concentrazione di PSA totale (tPSA) sia compresa nell'intervallo tra 4 e 10 µg/L e l'esplorazione rettale risulti negativa (1). Per valutare l'appropriatezza delle richieste di fPSA, abbiamo quindi verificato retrospettivamente la concentrazione di tPSA dei campioni pervenuti al nostro laboratorio per il dosaggio di fPSA in due periodi di tre mesi ciascuno, nel primo e nel secondo semestre 2005. Su un totale di 5773 richieste di tPSA, 2247 (38.9%) erano associate a fPSA, ma di queste solo 352 (15.7%) erano da considerarsi appropriate, mentre 1839 (81.8%) e 53 (2.5%), associate a concentrazioni di tPSA rispettivamente <4 µg/L e >10 µg/L, risultavano inappropriate. Il costo totale dei dosaggi non giustificati ammontava a € 8135 su base annua. Analizzando la provenienza delle richieste, si rilevava che, su un totale di 902 determinazioni di tPSA in pazienti ricoverati, nel 9.7% dei casi era richiesto anche il fPSA, ma solo in un quarto di questi in maniera appropriata. Nelle richieste di provenienza ambulatoriale, per un totale di 4871 tPSA, ben 2160 (44.3%) associavano fPSA. Tuttavia, solo una quota significativamente minore (n=330), pari al 15%, era richiesta per valori di tPSA compresi tra 4-10 µg/L; 1830 determinazioni di fPSA, pari ad un esborso annuo da parte del SSN (tariffa € 13.63 per test) di circa € 50.000, erano da ritenersi inutili. Dall'analisi dei nostri dati emerge quindi la necessità di interventi mirati al miglioramento dell'appropriatezza delle richieste di fPSA, soprattutto nei pazienti ambulatoriali nei quali, per un bacino di utenza come quello di un ospedale metropolitano di media grandezza, il numero di esami inappropriate è pari a circa 300 al mese. Un intervento di "autoprescrizione" del fPSA da parte del laboratorio, con un approccio tipo "reflex testing" in seguito alla determinazione del tPSA, potrebbe dimostrarsi efficace nel ridurre gli sprechi.

Bibliografia. Lilja H et al. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Prostate Cancer. www.nacb.org, 2006.

183

IMPORTANZA DI MARCATORI TUMORALI DI SUSCETTIBILITA' NEL CARCINOMA MAMMARIO

M. Garrubba¹, M. Savino¹, V. Valori¹, M. Carella¹, R. Murgo¹, M. Bisceglia¹, P. Parrella¹, F. Baorda¹, E. Maiello¹, S. A. Santini¹

¹Lab. di Analisi Chimico Cliniche, Osp. "Casa Sollievo della Sofferenza", San Giovanni Rotondo (FG)

Nella progressione tumorale l'angiogenesi gioca un ruolo centrale in quanto lo sviluppo di nuovi vasi favorisce la crescita tumorale. Uno dei principali fattori angiogenetici è, senza dubbio, il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Studi effettuati sul carcinoma mammario infiltrante hanno evidenziato non solo la presenza del fenomeno angiogenetico ma anche la sua correlazione sia con l'invasione neoplastica stromale e lo stato linfonodale sia con la prognosi. Al VEGF si associa un altro marcatore tumorale predittivo dello sviluppo metastatico nel carcinoma della mammella, l'HER2, una tirosin kinasi appartenente alla famiglia dei recettori di membrana Erb B. Infatti, studi recenti rivelano che le proteine HER2 e VEGF sono strettamente coinvolte nei processi di traduzione del segnale e che l'overespressione di HER2 aumenta la produzione della proteina VEGF.

Nel presente studio valuteremo la correlazione tra espressione sierica e tissutale del VEGF, il suo significato prognostico e l'influenza dell'HER2 sull'espressione di VEGF mediante metodiche EIA, immunisto chimica (IHC) e real time PCR.

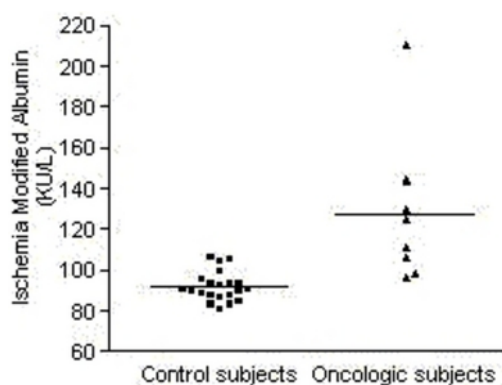
Sono stati finora raccolti oltre 200 campioni biologici (siero e sangue periferico) di pazienti con carcinoma mammario duttale invasivo per l'analisi di espressione del marcatore tumorale HER2. I risultati preliminari indicano che l'11% dei campioni analizzati mediante EIA e real time PCR presenta un'aumentata espressione di HER2 rispetto ad un valore di riferimento determinato su 50 campioni di controllo. Solo in una metà dei casi abbiamo ottenuto una buona correlazione, per quanto riguarda i livelli di espressione, con la metodica di IHC. Pertanto, nei campioni che presentano valori di espressione non molto distanti dal cut-off stabilito eseguiremo l'analisi di gene copy number mediante metodica FISH su tessuto. E', anche, in corso l'analisi di espressione del VEGF in campioni che presentano una aumentata espressione di HER2 mediante IHC.

La determinazione nel carcinoma della mammella di marcatori tumorali correlati allo sviluppo metastatico e la definizione del loro valore prognostico e predittivo di risposta al trattamento forniscono informazioni utili per una pianificazione razionale della terapia.

184

ISCHEMIA MODIFIED ALBUMIN IN GYNECOLOGIC MALIGNANCIESG. Lippi¹, A. Albiero², M. Montagnana¹, G. L. Salvagno¹, S. Scevarolli², S. Giudici², M. Franchi², G. C. Guidi¹¹Sezione di Chimica e Microscopia Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona²Sezione di Ostetricia e Ginecologia, Dipartimento Materno Infantile e di Biologia-Genetica, Università di Verona

Gynecologic cancer is a leading cause of death in the female sex. While uncommon, it is a devastating diagnosis and there is no effective screening tool. The Ischemia Modified Albumin (IMA) is a novel biomarker originally designed for identifying myocardial ischemia prior to necrosis. Nevertheless, IMA is non specific for cardiac pathologies, as elevated values are observed in a wide series of generalized or localized ischemic disorders. This preliminary investigation was aimed to analyze IMA values in gynecologic malignancies. IMA was assessed in 8 patients with gynecologic cancers (3 with ovarian cancer and 5 with endometrial carcinoma) and in 21 healthy matched female controls. IMA was determined by a colorimetric assay (ACB, Ischemia Technologies, Denver, USA) on the Modular System P (Roche Diagnostics GmbH). As shown in figure 1, mean IMA value is significantly elevated in cancer patients (128 ± 35 kU/L) than in healthy controls (91 ± 7 kU/L, $p < 0.001$). Moreover, the percentage of subjects exceeding the 95 kU/L diagnostic threshold for IMA is significantly higher among cancer patients than in the control population (100% versus 19%, $p < 0.001$). Preliminary results of this investigation testify that IMA is consistently and constantly elevated in gynecologic malignancies, suggesting that IMA measurement may be a valuable tool in both the diagnostic approach and follow-up of patients with cancer.



185

ASSOCIATION BETWEEN CUTANEOUS MELANOMA, BRESLOW THICKNESS AND VITAMIN D-RECEPTOR BsmI POLYMORPHISMC. Santonocito¹, M. M. Lavieri², P. Concolino¹, E. Torti¹, A. Paradisi², S. Gentileschi³, S. Rocchetti¹, E. Di Stasio¹, F. Ameglio¹, C. Zuppi¹, R. Capizzi², E. Capoluongo¹¹Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry & Clinical Biochemistry, Catholic University, Largo A. Gemelli 8, 00168 Rome, Italy²Institute of Dermatology, Catholic University, Largo A. Gemelli 8, 00168 Rome, Italy³Plastic Surgery Unit, Catholic University, Largo A. Gemelli 8, 00168 Rome, Italy

Background. Literature data reports an association between some Vitamin D Receptor (VDR) polymorphisms and different kinds of tumors, including melanoma. Only three VDR (FokI, TaqI and A-1012G) polymorphisms have been investigated in association with the presence of cutaneous malignant melanoma (MM) or metastasis development.

Aim. The present paper analyzes for the first time the association between BsmI polymorphism and melanoma prevalence together with Breslow thickness. In addition, the FokI SNP was also determined.

Materials and Methods. 101 MM and 101 healthy donors matched for age and sex were enrolled. Molecular VDR typing was performed by means of restriction length polymorphism analysis. Results. All cases and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium for BsmI, FokI and A-1012G. Significant associations between the BsmI-bb genotype frequency and melanoma patients ($P = 0.02$) along with Breslow thickness ($P = 0.001$) were found. This same behaviour was not observed for the FokI nor A-1012G polymorphisms. Multivariate logistic regression analysis confirmed these significant results after correction for age, gender, skin type, and MM localization. Conclusions. Although the biological meaning of the effects exerted by BsmI polymorphism is still under debate, the statistical association found in the present study suggests to verify this variant as a possible risk marker for MM and its aggressiveness, also considering that the real association may be due to other unknown genes linked to the BsmI-b allele.

References. Osborne JE, Hutchinson PE. Vitamin D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? Br J Dermatol. 2002;147:197-213. Review.

186

UPREGULATION OF NICOTINAMIDE N-METHYLTRANSFERASE IN HUMAN RENAL CLEAR CELL CARCINOMA

D. Sartini¹, G. Muzzonigro², G. Milanese², F. Pierella¹, V. Rossi¹, M. Emanuelli¹

¹*Institute of Biochemical Biotechnologies, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy*

²*Department of Urology, A.O.U. "Umberto I-Lancisi-Salesi", Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy*

RCC (Renal cell carcinoma) is the most lethal of the common urological malignancies and its large resistance to traditional chemotherapy and radiation determines its poor prognosis. To better identify patients at risk of metastasis and thereby select a more effective therapy, integrated prognostic systems should be developed, combining clinical-pathological features and new molecular markers defined by gene expression profiling. Here we describe the identification of NNMT (Nicotinamide N-methyltransferase) as a gene highly expressed in RCC, and its promising role as a novel biomarker for clear cell RCC. To explore the involvement of enzymes of drug metabolism in RCC, we analysed the gene expression profiles of tumour and non-tumour tissues obtained from the same patient by DNA microarray. NNMT was selected for further evaluation. NNMT mRNA expression was investigated in paired tissue samples from cancerous and noncancerous parts of the kidneys of 31 patients with RCC. Paired tissue samples were also obtained from 1 patient with oncocytoma. Measurements were performed by semiquantitative RT-PCR and quantitative real-time PCR. Western blot analysis and catalytic activity assay were also performed to study NNMT expression. A marked increased expression in the tumour tissue was found for NNMT, enzyme involved in the biotransformation of many drugs and xenobiotic compounds. Differential gene expression measurements (tumour versus normal tissue) revealed an upregulation in all clear cell RCCs, with fold change values ranging between 3 and 294 (mean 41-fold); on the contrary, both in chromophobe RCC and oncocytoma NNMT mRNA expression did not increase. In addition, NNMT expression showed a significant inverse correlation with tumour size, thus suggesting a role of NNMT in the early malignant changes (1). Our results indicate that a marked NNMT increase is a peculiar feature of clear cell RCC, and its expression levels might be valuable in the differential diagnosis and subclassification of renal cell tumours.

Reference. Sartini D et al.(2006) *J Urol.*, November, in press. We thank Dr. Richard Weinshilboum for providing NNMT antibody.

187

PROTEOMIC IDENTIFICATION OF HEAT SHOCK PROTEIN 27 AS A PROGNOSTIC MARKER IN NEUROBLASTOMA BUT NOT IN EWING'S SARCOMA

C. Zanini¹, F. Pulerà², F. Carta³, S. Crobu³, G. Giribaldi¹, G. Mandili⁴, M. Forni², F. Turrini¹

¹*Sez di Biochimica, Dip. Genetica, Biologia e Biochimica, Torino*

²*Div. di Anatomia Patologica, Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino*

³*Parco Scientifico Tecnologico PortoConte Ricerche, Alghero, Sassari*

⁴*Lab. di Biochimica, Centro di Ricerca in Medicina ed Oncologia Sperimentale (CERMS), Torino*

Aim. Neuroblastoma (NB) and Ewing's sarcoma (ES) represent the most common extracranial solid tumors of childhood. They both originate from the neural crest. NB is known to be more aggressive, ES is less malignant. Morphologic prognostic factors are applied in pediatric oncology but new markers that identify areas of cellular differentiation/maturation on histological sections, and with more sensitivity, may help to stratify patients according to risk groups. Some evidence suggests a relationship between expression of heat shock proteins (HSPs) and prognosis in different types of malignancies (1). In the present work we undertook a comparative proteomic analysis of NB and ES cell lines to look for new diagnostic or prognostic markers.

Methods. Following extraction of proteins and RNA, proteins from NB and ES cell lines were separated by 2-DE electrophoresis and identified by MALDI-TOF analysis. Gene expression of different identified proteins was performed by Real-Time RT-PCR. Paraffin-embedded tissue blocks from NB and ES were analyzed by immunohistochemistry.

Results. Protein expression profiles displayed a marked HSP27 and less marked HSP60, HSP70, HSPA8 and GRP75 up-modulations in NB cells. Gene expression analysis of identified chaperonins showed distinctive HSP27 over expression in NB compared to ES cells. Immunohistochemistry studies showed differences of HSP27 and HSP70 expression in NB and ES biopsies. HSP27 was less expressed whereas HSP70 was more expressed in the immature areas of NB. Lack of HSP27 immunoreactivity was observed in more aggressive forms and correlated with the presence of one or more negative prognostic factors. In ES, both chaperonins were expressed without characteristic patterns.

Conclusions. Proteomic and gene expression experiments have provided fresh information about HSP expression and regulation in NB and ES cell lines. Subsequent immunostaining studies on cancer biopsies have revealed that HSP27 and HSP70 are markers of neuronal differentiation in vivo and could be used in the assessment of the biological behaviour of NB and in the risk stratification of patients.

References. Thanner F, et al. Heat shock protein 27 is associated with decreased survival in node-negative breast cancer patients *Anticancer Res.* 2005;25:1649-53.

188

UTILIZZO DEL PARAMETRO MSCV DI COULTER LH 750 QUALE INDICATORE DELL'EMOLISI DA SPORT IN GIOCATORI DI RUGBYG. Banfi¹, G. Melegati¹, N. Di Gaetano², U. Malgeri², R. Simon-Lopez³¹IRCCS Galeazzi, Milano²Instrumentation Laboratory, Milano³Beckman Coulter, Nyon, CH

Nel corso del 2005 abbiamo seguito la squadra nazionale italiana di rugby per studiare il comportamento dei parametri ematologici durante la stagione competitiva. Gli atleti vanno incontro a fenomeni di emolisi che, se non controllati, possono mettere a rischio la salute dell'atleta stesso. Lo scopo di questo lavoro è stato valutare le variazioni dei parametri ematologici (emocromo, formula leucocitaria e reticolociti) degli atleti prima e durante la fase di intensa attività sportiva. 52 campioni di sangue (26 atleti) sono stati prelevati in 2 momenti diversi (T1= fase di riposo e T2= fase competitiva) con provette Vacutainer K3EDTA e analizzate con Coulter LH 750 con profilo CBC/Diff/Ret opportunamente calibrato e controllato. È stata effettuata un'analisi statistica (t-test appaiato) delle variazioni dei parametri MCV, MRV, e MSCV allo scopo di monitorare fenomeni emolitici dovuti all'affaticamento. Il parametro MSCV ha mostrato utilità clinica nel monitorare la fragilità della membrana eritrocitaria.

I parametri MCV e MSCV hanno mostrato valori simili nella T1 (t test, $p=0,33$), indicando una sostanziale assenza di emolisi. I due parametri hanno al contrario mostrato una significativa differenza ($p<0,0001$) nei valori ottenuti in T2 suggerendo la possibile insorgenza di emolisi. Significativa è risultato anche il valore di MSCV al T2 rispetto a T1. Abbiamo inoltre evidenziato alcuni atleti per i quali la differenza tra i valori dei parametri MCV e MSCV nella fase competitiva era particolarmente significativa e per i quali il valore del dosaggio di Bilirubina indiretta erano significativi di una sopraggiunta emolisi da fatica. Per uno degli atleti i valori del parametro MSCV sono risultati 89,62 in T1 e 85,41 in T2 e i valori di bilirubina indiretta sono risultati 0,32 e 0,96 mg/dl in T1 e T2.

Lo studio effettuato su atleti di rugby ha evidenziato e confermato la presenza di emolisi nella fase competitiva. L'analisi dei dati di emocromo e profilo reticolocitario forniti da Coulter LH 750 ha permesso di rilevare la fragilità della membrana eritrocitaria mediante il parametro MSCV che variando significativamente dalla fase di riposo alla fase competitiva ha suggerito la comparsa di emolisi da fatica confermata dai valori di bilirubina indiretta.

189

VALUTAZIONE DEL RECETTORE SOLUBILE DELLA TRANSFERRINA IN ATLETI DI ELITE CON IDEa-ITG. Banfi¹, A. Pacioni², B. Costantino³, M. Freschi⁴, R. Graziani⁵¹IRCCS Galeazzi, Milano²Dasit, Milano³Piacenza Calcio⁴FISI, Milano⁵CEDAL, Gallarate (VA)

Il recettore solubile della transferrina è stato proposto come marker biochimico indiretto per il monitoraggio degli atleti e la prevenzione all'uso di r-HuEpo. Nello studio abbiamo valutato il s-TFR in atleti di elite di calcio e sci con un metodo immunoturbidimetrico del commercio (sTFR IDEa IT Orion, Dasit SpA). s-TFR è stato dosato su siero di 135 campioni: 76 calciatori di serie A e C e 59 campioni di 32 sciatori della nazionale. Per 18 sciatori (9 M, 9 F) sono stati confrontati s-TFR, parametri biochimici del bilancio marziale, emocromo e reticolociti in due fasi della stagione agonistica: allenamento (Luglio '05) e competizione (Gennaio '06). I valori di s-TFR ottenuti con kit IDEa sono stati confrontati con altro metodo immunoturbidimetrico (Quantex Biokit). s-TFR e parametri biochimici sono stati analizzati su strumento Abbott Aeroset, emocromo e reticolociti su Abbott CD-3700.

Risultati. Gli intervalli di riferimento di s-TFR ($2.5^{\circ}-97.5^{\circ}$ perc.) nei 135 campioni esaminati sono compresi negli I.R. dei soggetti sedentari, con range di 0.84-1.64 mg/L. Il C.V. tra serie su 26 campioni è stato di 2.3%, a conferma delle ottime prestazioni descritte in metodica (CV max. nella serie 1.8%, tra serie 2.6%).

Nei calciatori s-TFR ha valori significativamente più elevati che negli sciatori: mediana 1.21 vs 1,07 mg/L, $p=0.0015$. Non si notano differenze significative di s-TFR ($p=0.34$) tra sciatori maschi e femmine.

Nel confronto tra periodo di allenamento e competizione su 18 sciatori, s-TFR e RET% sono i parametri con variazioni più significative ($p=0.08$ e 0.03) rispetto a RBC, HGB, Ferro, Transferrina, Ferritina, TSAT (rispettivamente $p=0.63;0.81;0.74;0.30;0.49;0.98$). I due metodi valutati per il dosaggio di s-TFR sono ben correlati ($r=0.85$, $p<0.0001$) ma hanno I.R. e valori non commutabili (bias medio=0.38 mg/L).

Conclusioni. I risultati confermano la validità analitica del kit IDEa, l'utilità diagnostica del sTFR nel monitoraggio degli atleti, l'importanza di definire I.R. specifici per disciplina. I valori di sTFR sono metodo dipendenti: necessita uno standard di riferimento internazionale per ottenere valori commutabili tra metodi diversi.

190

ASSOCIATION OF INTERLEUKIN-1BETA POLYMORPHISMS WITH ATHLETE PHENOTYPE

M. Di Santolo¹, G. Casabellata¹, G. Banfi², S. Cauci¹

¹Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Udine

²Direzione Sanitaria, Istituto Ortopedico Galeazzi, and Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Milano, Milano

Objective. Single nucleotide polymorphisms (SNP) of the IL-1B gene are associated with differential levels of cytokine expression and may influence the severity of the local and systemic inflammatory response. Inflammation appears to play an important role in the repair and regeneration of skeletal muscle after an acute bout of resistance exercise. The aim of this study was to determine the frequency distribution of -511 and +3953 C/T polymorphisms of the IL-1B gene in female athletes and in sedentary women.

Methods. We enrolled 404 Northern Italian women (aged 18-41 years): 104 athletes (>5 hours for week) and 300 sedentary controls (<2 hours for week). DNA was obtained from vaginal swab samples using salting out technique. The extracted DNA was analysed for the polymorphisms C/T in position -511 and +3953 by polymerase chain reaction (PCR). Amplicons were digested with restriction enzymes (AvaI for -511, and TaqI for +3953).

Results. In our case control association study, the genotypes of the IL-1 β -511 and +3953 gene were not significantly different between athletes and controls.

Conclusion. Our data do not support a role for these two polymorphisms in the athlete phenotype.

Reference. Dennis RA, Trappe TA, Simpson P, Carroll C, Huang BE, et al. (2004) Interleukin-1 polymorphisms are associated with the inflammatory response in human muscle to acute resistance exercise. *J Physiol* 560:617-626.

191

MUCOSAL INNATE IMMUNITY IN RELATION TO PHYSICAL EXERCISE IN YOUNG ITALIAN WOMEN

G. Casabellata¹, M. Di Santolo¹, S. Cauci¹

¹Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Udine

Introduction. Physical exercise is supposed to have an impact on immunity. No conclusive data are available in the scientific literature on the adverse/protective effects of exercise at mucosal level. Susceptibility to infections at mucosal sites could be affected by physical activity throughout modulation of local innate immunity. Sport exercise has been associated with increased prevalence of yeast urogenital tract infections. Our aim is to determine levels of innate immunity factors in vaginal secretions of healthy women according to physical activity.

Methods. A total of 100 healthy fertile women aged 18-41 (24 ± 5 years) performing 0-20 (6 ± 5 h) hours exercise per week were enrolled among volley and basket non professional athletes and matched sedentary women. Women with vaginal infections were excluded. Number of vaginal neutrophils was determined by evaluation of the Gram stained smear of vaginal secretions. IL-1beta and IL-8 in vaginal fluid were determined by commercial ELISA assay.

Results. We found that concentrations of IL-1beta and the number of vaginal neutrophils were negatively associated with hours of exercise per week: $r = -0.242$, $p = 0.040$, and $r = -0.252$, $p = 0.025$, respectively. Athletes demonstrated lower levels of IL-1beta ($p = 0.001$) and number of neutrophils ($p = 0.045$) than sedentary controls.

Conclusions. In this study, we showed that exercise down regulates vaginal levels of the main proinflammatory cytokine, IL-1beta, and of the main white cells, neutrophils, devoted to combat microbial infections at mucosal sites. Our findings could support the hypothesis that exercise favors infections at mucosal sites by dampening local innate defense. However, it cannot be excluded that exercise increases the anti-inflammatory response and thus protects the host by adverse effects of excessive inflammatory reactions.

Rereference. S. Cauci (2004) Vaginal immunity in bacterial vaginosis. *Curr Infect Dis Reports*; 6:450-456.

192

BEHAVIOUR OF RETICULOCYTE COUNTS AND IMMATURE RETICULOCYTE FRACTION DURING A COMPETITIVE SEASON IN ELITE ATHLETES OF FOUR DIFFERENT SPORTS

M. Del Fabbro¹, G. Banfi¹

¹*IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano*

Objectives. The role of reticulocytes (Ret) in sports medicine became important when the count of immature erythrocytes has been introduced in protocols used and officially approved for antidoping purposes; the use of modern automated analyzers, which allow the easy count and the description of characteristics of reticulocytes, increased the possible use of these parameters in sports medicine. We assessed the Ret counts and their parameters in athletes before and during training and competitions.

Methods. The athletes recruited were 13 rugby players of the Italian National Team, 12 alpine skiers of Italian National Team, 19 professional cyclists of one of ProTour teams, and 19 football players of First Division National Italian championship.

The blood drawings were performed before the start of training, at the start of championship or competitive season, during the season, and at the end of season. The analyses have been performed by using Abbott Cell Dyn 3700.

Results. There were some statistical significant differences between values of Ret and IRF in athletes during the competitive season, particularly in heavy competitive periods, whereas no differences were found among Ret and IRF values of athletes of different sports. There was not a correlation between Ret and Hb: the coefficient of correlation in all the athletes between the values of Ret and Hb was 0.13 and between the values of IRF and Hb was 0.21.

Conclusions. Our study is the first research concerning the Ret counts and maturity monitoring during a competitive season in elite athletes of various sports. We confirm the stability of Ret counts, also during training and competitions, although some modifications, namely decrease during competitions periods, happen. IRF values tend to be high in athletes owing to bone marrow continuous stimulation linked to haemolysis, typical of sports activities. We confirm the validity of the use of Ret counts for antidoping purposes and also for evaluating health status and iron metabolism of sportsmen.

193

CREATININE VALUES IN ELITE RUGBY PLAYERS MEASURED BY MEANS OF CYNETIC JAFFE AND ENZYMATIC METHODS

M. Del Fabbro¹, G. Banfi¹, L. Monopoli³, A. Barassi², W. Porreca³, G. Melzi d'Eril²

¹*IRCCS Galeazzi, Milano*

²*Dip Med Chir Odont, Univ Milano*

³*Laboratorio Analisi, H San Paolo, Milano*

Objectives. Creatinine measurement is routinely performed in athletes, who have usually values higher than those found in sedentary people, owing to their higher muscular mass, as already demonstrated by our group in top level sportsmen competing in eight different sports. There is a correlation between body mass index (BMI) and elite athletes, particularly evident in rugby players characterized from high BMI values. The creatinine measurement by classic Jaffe method could be influenced by various interferences whereas enzymatic methods should be not: the specificity is particularly important in athletes to avoid misinterpretation and unnecessary further examinations.

Methods. We measured creatinine on 127 sera of 57 rugby players. Blood drawings were performed at 4 different times from May 2005 to January 2006. Creatinine was measured by Jaffe on Abbott Aeroset and enzymatically on Vitros OCD.

Results. The mean concentration of creatinine measured by Jaffe method was 1.22 ± 0.13 mg/dl, whereas the concentration by enzymatic method was 1.28 ± 0.14 mg/dl ($p < 0.01$, Student's paired test).

Conclusions. The use of an enzymatic method did not clinically modify the interpretation of creatinine values in athletes characterized from high values of BMI and creatinine. Surprisingly, enzymatic method supplied values slightly higher, possibly due to reconditioning of calibration values of the method to obtain homogenous data when compared with non enzymatic ones. This could be important for the use of equations, now internationally recommended, for estimating renal function.

194

ALTITUDE EXPOSURE AND ENDURANCE ATHLETES: INDIVIDUAL RESPONSE OF HEMATOLOGIC PARAMETERSG. L. Salvagno¹, G. Lippi¹, F. Balestrieri¹, M. Montagnana¹, F. Schena¹, G. C. Guidi¹¹Sez. Chimica e Microscopia Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona, Verona, Italy

The enhancement of the red blood cells (RBC) mass in athletes has several advantages, optimizing the blood oxygen carrying capacity and improving athletic performances, especially in endurance sports. Altitude training is a method frequently used by competitive athletes to improve the sea-level performance. Despite promising results, some later investigations described a wide interindividual variability in adaptive response and athletic performance after a traditional altitude training camp, allowing the clustering of athletes between subjects who respond to altitude training and those who are "nonresponders".

The present investigation was planned to identify the variations in the metabolic and hematologic adaptations to altitude training in elite endurance athletes (professional cross-country skiers), considering also the balance between beneficial effects and virtual complications of different typologies of endurance hypoxic training in these peculiar subset of competitive athletes. Blood samples were collected at the baseline, in the middle and at the end of the competitive season in 23 athletes. Different haematological parameters were analysed and results are shown in table 1.

A wide interindividual variability and a highly heterogeneous response of the iron profile and both hematocrit and haemoglobin could be observed to high altitude training, suggesting that the improvement of the athletic performance following hypoxic training may not be universally achievable.

Reference. Levine BD, Stray-Gundersen J. Exercise at high altitudes. In: Current Therapy in Sports Medicine (3rd ed), edited by Torg JS and Shepard RJ. St. Louis, MO: Mosby-Year Book, 1995;588-93.

n=23	Non responders (n=4)			Responders (n=19)		
	Beginning	End	Dif. (%)	Beginning	End	Dif. (%)
Hematocrit, %	48.7±2.7	47.6±3.5	-2.4	44.1±3.3	47.1±2.6	7
Hemoglobin, g/dl	16.2±0.9	16.1±1.1	-0.9	15.0±1.3	15.9±1	6.3
MCH,pg	29.5±0.9	30.2±0.5	2.6	29.9±0.8	30.1±0.7	1
PLT,	267±24	264±41	-1.4	252±47	260±54	3.1
Iron	150±19	108±40	-27	113±45	129±41	27
Transferrin g/L	2.6±0.4	2.4±0.3	-6.9	2.2±0.3	2.3±0.3	1.8
Ferritin, mcg/ml	252±246	243±192	-	153±120	163±108	-
Epo, mU/ml	17±4.4	10.3±2.5	-38	14.8±7.4	11.1±4.4	-18
sTFR, mg/ml	1.9±0.2	1.8±0.1	0	1.4±0.3	1.5±0.3	11.1

195

LA PRESENZA DI COMPONENTI MONOCLONALI IN DONATORIL. Bassi¹, S. Rizzardi¹, M. Crotti²¹Laboratorio Analisi, Azienda Istituti Ospitalieri, Cremona²Centro Immunotrasfusionale, Azienda Istituti Ospitalieri, Cremona

Scopo. La disposizione di legge DM 3 marzo 2005 prevede l'esecuzione dell'elettroforesi di screening su tutti i donatori. Scopo del lavoro è stato: valutare l'incidenza di riscontro delle componenti monoclonali (CM) nei donatori afferenti al nostro Centro Trasfusionale, se la % di positività rientrava nei limiti normalmente osservati nella popolazione afferente al laboratorio e l'aumento del carico di lavoro per elettroforesi. La normativa è stata applicata dal settembre 2005 e la statistica di valutazione si riferisce al periodo settembre/dicembre 2005.

Materiali e Metodi. Lo screening dei donatori prevede un aumento del carico di lavoro dell'elettroforesi (EF) di circa 7000 esami anno. Giornalmente sono eseguiti circa 30 campioni che richiedono l'utilizzo di un gel di agarosio (SEBIA) in più rispetto alla routine ordinaria di circa 150 campioni.

Per la valutazione delle CM sono state eseguite immunofissazioni (IF) su agarosio (Sebia). Sono state calcolate le EF dei pazienti interni ed esterni eseguite nel periodo in esame e le IF negative e positive (considerando sia le nuove riscontrate sia quelle ripetute su pazienti già noti per controllo).

Per i donatori, analogamente, sono state considerate le EF eseguite e le IF che, se positive, sono tutte di prima valutazione.

Campioni Interni/Esterni. EF 10653; IF+ 503; IF- 394; %POS 4,7; %NEG 3,7

Donatori. EF 2452; IF+ 35; IF- 26; %POS 1,4; %NEG 1,1
Le 35 IF positive sono così distribuite: 16 IgGK, 16 IgGlambda, 1 IgAlambda, 1 IgMK e 1 IgMlambda con una percentuale del 45.7% per i due gruppi più rappresentativi. La percentuale di IF positive nel gruppo dei pazienti interni ed esterni, per la medesima tipizzazione, è 33.8% per IgGK e 19.7% per IgGlambda.

Conclusioni. Dai dati raccolti si osserva come la percentuale di IF positive nei donatori, che rappresentano una popolazione selezionata, sia inferiore a quella della popolazione generale. Tutte le IF sono però di prima valutazione e l'età media dei pazienti positivi è inferiore ai 50 anni. Questo dato deve essere accuratamente valutato, per la necessità di monitorare i pazienti per verificare la possibilità di sviluppo di patologie associate alla CM riscontrata.

196

APPLICAZIONE DELL'IMMUNOSOTTRAZIONE NELLA DETERMINAZIONE DELLA TRANSFERRINA CARBOIDRATO-CARENTE IN HPLC

V. Bianchi¹, A. Roveta²

¹Laboratorio di Tossicologia Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C Arrigo Alessandria

²Scuola di Specializzazione Patologia Clinica Università degli Studi Novara

Obiettivo. La transferrina carboidrato carente (CDT) marcatore di abuso alcolico cronico, utilizzato sempre più spesso per motivi medico legali, deve essere individuata e quantificata in modo certo al fine di garantire al cittadino i diritti sanciti dalla Costituzione (art 13).

Scopo del presente lavoro è valutare la specificità del metodo HPLC nell'abuso alcolico cronico.

Materiali e Metodi. Per la determinazione della frazione CDT è stato utilizzato il kit commercializzato da Biorad : colonna scambio ionica, rilevazione a 460 nm, fase mobile ternaria con tamponi a diverso pH , volume di iniezione a 100 ul, tempo di analisi 10 min.

Per l'immunosottrazione viene utilizzato un anticorpo antitransferrina (Dako) opportunamente preparato per l'analisi in HPLC.

Sono stati valutati campioni normali (disialotransferrina < 1.8%), patologici (>2.0) e campioni con presunte interferenze

Considerazioni Conclusive. I risultati preliminari, fino ad oggi ottenuti dimostrano che nei casi di valenza medico legale, la tecnica dell'immunosottrazione conferma ulteriormente la specificità del metodo HPLC.

Bibliografia. Lanz C, Marti U, Thorman W " CZE with a dynamic double coating for analysis of carbohydrate-deficient transferrin in human serum. Precision performance and pattern recognition" J Chromat.A 1013(2003)131-147

197

MICROALBUMINA NELLE URINE: CONSIDERAZIONI PRELIMINARI SU UN METODO IN HPLC E CONFRONTO TRA UN SOLIDO DOSAGGIO NEFELOMETRICO

V. Bianchi¹, M. Foco¹, C. Arfini¹

¹SOC Laboratorio Analisi Dipartimento di Patologia Clinica Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C Arrigo Alessandria

Obiettivo. Recenti pubblicazioni hanno riportato che l'albumina viene escreta sotto diverse forme, alcune delle quali non sono immunologicamente reattive ma comunque importanti perché predittive di futuri danni cardiovascolari.

Scopo del lavoro è stato quello di sperimentare due modalità di integrazione per la valutazione dell'albumina utilizzando un kit per HPLC recentemente commercializzato in Italia e confrontare i risultati ottenuti con un metodo nefelometrico

Materiali e Metodi. Pazienti: 29 pazienti (l'urina del mattino) con microalbuminuria 9-80 mg/l con metodo nefelometrico. È stato determinato il rapporto Albumina/Creatinina

Determinazione dell'albumina. Human-Albumin Dade Behring e "Accumin": Albumina HPLC AUSAM

Determinazione della creatinina. Metodo enzimatico su ADVIA 2400 Bayer

Risultati. I campioni sono stati determinati in nefelometria e divisi in due gruppi: positivi (58%) e negativi (42%) in base all'intervallo discriminante 30-299 mg/g creatinina raccomandato dall'American Diabetes Association.

Confrontando questi valori con quelli ottenuti in HPLC con i due diversi tipi di integrazione sono stati definiti 3 sottogruppi per ciascun gruppo iniziale e di questi sono stati valutati numerosità, percentuale, risultati e correlazione tra i metodi tenendo anche conto delle diverse modalità di integrazione

Considerazioni Conclusive. La valutazione dei risultati nel loro insieme evidenzia una correlazione modesta tra i due metodi (HPLC vs nefelometrico), la correlazione migliora, anche se modestamente, se si utilizza un'integrazione di tipo tailing (r=0,71). Generalmente il valore ottenuto in HPLC è maggiore di quello ottenuto con metodo nefelometrico. Si potrebbe pensare che nel metodo cromatografico il picco dell'albumina sottenda altre proteine. I dati presentati tuttavia, data la loro modesta numerosità, sono statisticamente poco significative per poter trarre delle conclusioni. Sarebbe auspicabile effettuare trials clinici per definire appropriati valori di riferimento e livelli decisionali per i dosaggi in HPLC per l'interpretazione clinica.

Bibliografia. Comper W, Osicka T "Detection of urinary albumin" Advances in Chronic Kidney Disease vol 12, n 2 2005: pagg 170-176

198

EFFETTO DI MONOMERI METILACRILICI DELLE RESINE COMPOSITE PER USO ODONTOIATRICO SUL METABOLISMO REDOX DEL GLUTATIONE

C. Callà¹, G. Nocca¹, F. De Palma¹, A. Minucci¹, M. L. Gozzo¹, A. Lupi²

¹Ist. Biochimica e Biochimica Clinica Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Ist. di Chimica del Riconoscimento Molecolare, C.N.R., Roma

Monomeri metilacrilici come trietilene glicoledimetilacrilato (TEGDMA), idrossietilmetacrilato (HEMA) e bisfenol A glicerolato dimetilacrilato (Bis-GMA) sono largamente presenti nei materiali compositi auto e fotopolimerizzanti per uso odontoiatrico e per altre applicazioni biomediche. Durante l'applicazione clinica piccole quantità di monomeri vengono rilasciati nella cavità orale o nella camera pulpale dalla quale possono raggiungere il circolo ematico. Conseguentemente i monomeri possono provocare, o contribuire a provocare, gli effetti biologici avversi che sono stati osservati in vivo. Le ricerche sulla biocompatibilità dei materiali dentali cercano di analizzare i meccanismi responsabili di tali effetti, in particolare è stato osservato che i metacrilati hanno la capacità di determinare una diminuzione della concentrazione del glutatione sia per ossidazione dello stesso che mediante la formazione di un addotto tra metilacrilati e glutatione. Scopo del presente lavoro è quello di verificare se TEGDMA, Bis-GMA ed HEMA inducono un'alterazione nel metabolismo redox del glutatione nella linea cellulare HL-60. La concentrazione di glutatione è stata valutata nelle cellule incubate per 2 ore con i monomeri mediante reazione colorimetrica.

Le attività enzimatiche della glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PDH) e della Glutatione Reduttasi (GR) sono state determinate sugli estratti cellulari interi tramite Olympus AU 400 e gli appropriati kit G6PDH e GR Randox (Sigma). L'analisi statistica dei risultati è stata eseguita tramite analisi della varianza p minore di 0.05 è stato considerato significativo. I risultati ottenuti indicano che TEGDMA ed HEMA inducono un significativo decremento della concentrazione del glutatione ridotto e totale ed un incremento nell'attività di entrambi gli enzimi. Il Bis-GMA non interferisce con nessuno dei fattori analizzati. Concludendo si può dire che tale studio contribuisce alla comprensione dei meccanismi alla base degli effetti avversi osservati nella pratica clinica, quindi le alterazioni nel metabolismo redox del glutatione indotte da TEGDMA e HEMA meritano di essere considerate negli studi di biocompatibilità dei materiali dentali.

Bibliografia. Geurtsen W. J Dent Res. 2001; 80(12): 2046-50

199

GLUCOSIO-6-FOSFATO DEIDROGENASI CARENZA IN PAZIENTI CON OCCLUSIONE VENOSA DELLA RETINA

A. Bacciu¹, F. Serralutzu¹, P. Occhineri¹, A. Pinna², C. Carru¹, G. Solinas³, F. Carta², L. Deiana¹

¹Dipartimento di Scienze Biomediche-Biochimica Clinica Università degli Studi di Sassari

²Clinica Oculistica - Università degli Studi di Sassari

³Istituto di Igiene Università degli Studi di Sassari

La prevalenza del difetto della G6PD in Sardegna varia dal 10 al 15%. Recenti studi hanno evidenziato che pazienti con il deficit G6PD risultano maggiormente protetti da attacchi ischemici e da malattie cerebrovascolari. I soggetti con occlusione della vena della retina, importante causa per la perdita della vista e che può riguardare la circolazione ematica nella vena centrale o di una sua branca, sono maggiormente esposti a possibile danno vascolare con una probabilità tra 50 e il 70%. Lo scopo dello studio è stato di valutare l'incidenza del deficit G6PD in pazienti sardi con occlusione venosa della retina e verificare se tale deficit possa avere un effetto protettivo verso i disordini vascolari. Sono stati misurati i livelli ematici di G6PD in 169 pazienti (93 maschi; 76 femmine) con occlusione della vena centrale della retina (CVRO) e in 170 pazienti (78 maschi, 92 femmine) occlusione di una branca della vena centrale della retina (BVRO). Un gruppo di 284 soggetti (146 maschi, 138 femmine) sottoposti a intervento chirurgico per cataratta scelti come soggetti di controllo. Il difetto della G6PD è stato trovato in 6 (3,55%) dei 169 pazienti con CVRO; in 9 (5,29%) dei 170 pazienti con BVRO, e in 25 (8,8%) di 284 soggetti di controllo. Le differenze tra i pazienti CVRO e i soggetti di controllo sono risultate significative (OR: 0.38%; 95% CI: 0.12-0.98); mentre le differenze tra i tra i pazienti BVRO e i soggetti di controllo non sono risultate significative (OR: 0.58%; 95% CI: 0.23-1.32). In Sardegna l'incidenza del difetto della G6PD nei pazienti con occlusione della vena della retina è risultato più bassa rispetto ad una popolazione di controllo. I risultati suggeriscono che i pazienti con difetto della G6PD hanno una significativa riduzione del rischio di sviluppare la CVRO.

200

IL RECETTORE SOLUBILE DELLA TRANSFERRINA NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DI ANEMIA DA CARENZE DI FERRO DA ANEMIA DA MALATTIE CRONICHE IN PAZIENTI IN ETÀ GERIATRICA.

I. Cataldo¹, M. Travaglini¹, C. Romano¹, T. Sacco¹

¹Lab. di Patologia Clinica I, Osp. Clinicizzato SS. Annunziata, Chieti

Scopo del lavoro. Valutare il ruolo di questo nuovo marcatore biochimico del metabolismo del ferro nel rilevare la carenza di ferro in quei pazienti in età geriatrica dove alla presenza di un'anemia da carenze di ferro è spesso presente una anemia da malattie croniche. Inoltre abbiamo voluto correlare i diversi parametri (RBC, HGB, PCR, AAG, TFR, FR, STFR, MCV, SI) oggetti dello studio nei vari gruppi di pazienti esaminati.

Materiale e Metodi. Sono stati esaminati 70 pazienti in età geriatrica ricoverati presso la Clinica Geriatrica dell'Ospedale SS. Annunziata Chieti. I soggetti sono stati suddivisi in tre gruppi, il primo comprendeva 20 pazienti non affetti da anemia (NA), il secondo 25 soggetti con anemia da carenza di ferro (IDA), il terzo 25 soggetti affetti da malattia cronica (ACD). Sono stati inoltre utilizzati come gruppo di controllo 20 soggetti donatori di sangue (CON). L'esame emocitometrico è stato eseguito sullo strumento SySmex XE 2100 della ditta Dasit, mentre la sideremia con lo strumento Vitros 950 della ditta Ortho Clinical Diagnosti. Gli altri parametri biochimici del metabolismo del ferro, ferritina, transferrina, recettore solubile della transferrina, proteina C reattiva e alfa 1 glicoproteina acida sono stati determinati con il Nefelometro BN II della ditta Dade Behring.

Risultati. L'analisi statistica di Skewness per i gruppi presi in esame dimostra una distribuzione non gaussiana dei dati. Il test di Kuskall Wallis evidenzia una differenza significativa fra i gruppi. Abbiamo applicato il test di Mann Withey per il confronto tra il gruppo ACD e gli altri.

Conclusioni. I risultati ottenuti hanno evidenziato che per il recettore solubile della transferrina c'è una differenza significativa tra il gruppo di pazienti con IDA rispetto agli altri. Quindi il recettore rappresenta un marker funzionale della carenza di ferro ed ha un ruolo centrale nel rilevare correttamente una anemia da deficit di ferro nei pazienti in età geriatrica.

Bibliografia. Hanif E., Ayyub M., Answar M., Ali W., Bashir M. Evaluation of serum transferrin receptor concentration in diagnosing and differentiating iron deficiency anaemia from anaemia of chronic disorders. J Pak Med Assoc. 2005;55:13-6.

201

ELEVATED SIALIDASE AND/OR PROLIDASE COMBINED WITH VAGINAL pH_≥5 ARE PREDICTIVE BIOMARKERS FOR LOW BIRTH WEIGHT AND EARLY PRETERM BIRTH

S. Cauci¹, J. McGregor², P. Thorsen³, J. Grove³, G. Casabellata¹, M. Di Santolo¹, D. De Santo⁴, F. De Seta⁴, S. Guaschino⁴

¹School of Medicine Udine, IT

²School of Medicine Los Angeles, US

³School of Medicine Aarhus, DK

⁴School of Medicine Trieste, IT

Introduction. Preterm birth is a multifactorial condition. There is consistent evidence that infections are responsible for the majority of early preterm birth (<32 weeks of gestation). Vaginal infections especially bacterial vaginosis (BV) have been associated with adverse pregnancy outcomes.

Objective. To determine whether easy to measure vaginal fluid biomarkers are predictive for low birth weight (LBW, <2500g), very LBW (VLBW, <1500g), spontaneous preterm at <37 weeks of gestation, and total preterm deliveries at <37, <35, <32 weeks of gestation, respectively.

Methods. Vaginal fluid pH<5 or ≥5 combined with low and high cutoffs for sialidase and prolidase activities were examined in a nested case-control study of 579 Danish women (from a study population of 2,846 women) with samples collected at mean 17 weeks of gestation. 116 LBW (17 VLBW), 117 preterm deliveries (85 spontaneous), and 418 normal term deliveries were analyzed.

Results. Vaginal pH≥4.7 or pH≥5 by itself was not associated with LBW or prematurity. Conversely, combination of pH≥5 and high sialidase activity demonstrated OR 17 (CI 1.8-150) for LBW; OR 31 (CI 1.8-516) for VLBW; along with OR 18 (CI 1.6-204) for preterm at <35 weeks and OR 31 (CI 1.9-542) for preterm at <32 weeks of gestation. The combination of pH≥5 and high prolidase activity demonstrated OR 13 (CI 1.3-122) for LBW; OR 33 (CI 2.0-553) for VLBW; as well as OR 9.2 (CI 0.6-150) for preterm at <35 weeks and OR 35 (CI 2.0-586) for preterm at <32 weeks of gestation. In this population, no woman having high sialidase and high prolidase activity had a term birth, nor a baby weighting ≥2500g at birth.

Conclusion. In this Danish population, mid gestation findings of vaginal fluid elevated pH with sialidase and/or prolidase were associated with LBW, VLBW, and early preterm at <35, or <32 weeks of gestation.

Reference. Cauci S, McGregor J, Thorsen P, Grove J, Guaschino S. Am J Obstet Gynecol 2005;192:489-96.

202

PRIMI RISULTATI NELLO STUDIO DELLE APTOGLOBINE IN UNA POPOLAZIONE SARDA

M. A. Cuccuru¹, F. Carta², M. E. Sini¹, P. Occhineri¹, G. Baggio³, F. Turrini², L. Deiana¹

¹Dip. Scienze Biomediche - Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università di Sassari

²Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Sezione di Biochimica, Università di Torino

³Azienda Ospedaliera - Università di Padova

L'aptoglobina (Hp) è una glicoproteina sierica con struttura polimerica, costituita da due tipi di catene polipeptidiche: catena β (≈ 42 KDa), catena α ($\alpha_1 \approx 8,9$ KDa, $\alpha_2 \approx 16$ KDa). Gli esseri umani sono polimorfici per l'Hp, con tre importanti fenotipi: Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2. L'Hp svolge diverse funzioni: legando l'emoglobina (Hb) circolante impedisce il rilascio del ferro proteggendo il tessuto renale da eventuali danni e agendo contemporaneamente da importante antiossidante. Le concentrazioni plasmatiche di Hp ed i diversi fenotipi sono stati correlati con varie forme patologiche. In questo studio sono state analizzate, mediante approccio proteomico le diverse catene polipeptidiche che costituiscono l'aptoglobina, a tal fine sono stati presi in considerazione 129 campioni plasmatici prelevati da individui sardi di età compresa fra i 60 e i 105 anni. I campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi bidimensionale e i gel analitici ottenuti sono stati analizzati attraverso l'ausilio del PDQuest-software. Successivamente gli spots proteici da 42KDa, 16KDa e 8.9KDa, sono stati staccati dai gels bidimensionale-preparativi ed analizzati attraverso spettrometria di massa (MALDI-TOF e Q-TOF). Il presente studio indica che nei campioni plasmatici analizzati le subunità Hp- α_2 sono più frequenti rispetto alle subunità Hp- α_1 , suggerendo che nella popolazione studiata il fenotipo omozigote Hp2-2 sia più comune del fenotipo omozigote Hp1-1. I dati disponibili sino a questo momento indicano infatti che circa il 10% della popolazione in esame ha fenotipo Hp1-1, il 30% fenotipo Hp2-2 ed il 60% fenotipo Hp2-1. Si rileva inoltre che la frequenza fenotipica per l'Hp degli individui più longevi rispecchia l'andamento osservato per la popolazione sarda studiata. Lo studio presente sottolinea la presenza di diverse isoforme sia per la subunità Hp- β che per le subunità Hp- α (Hp- α_1 e Hp- α_2), si rileva inoltre che la concentrazione plasmatica delle isoforme Hp- β e Hp- α_2 aumenta con l'età mentre la concentrazione delle isoforme Hp- α_1 non varia in modo significativo con l'invecchiamento. Ulteriori studi sono necessari per capire se le diverse isoforme osservate sono dovute a variabilità genetiche oppure a modificazioni post-traslazionali delle catene aptoglobiniche.

203

ENGINEERING DIPHTERIA TOXIN IN PANCREATIC CANCER CELLS: A PROMISING TOOL FOR THERAPY

E. Fadi¹, P. Fogar², F. Navaglia¹, A. Padoan¹, D. Basso¹, E. Greco¹, A. Stranges¹, C. Zambon², A. Falda¹, S. Pedrazzoli², M. Plebani¹

¹Dep. Laboratory Medicine, University of Padova, Italy

²Dep. of Medical and Surgical Sciences, University of Padova, Italy

Introduction. Diphtheria toxin is a promising tool for cancer cell killing. It causes cell death by an apoptosis-mediated pathway catalysing ADP-ribosylation of elongating factor 2. Our aim was to test DT catalytic subunit (fragment A 1-193 aa residues) (DTA) efficacy in killing 5 different pancreatic cancer cell lines obtained from primary (BxPC3, PANC1, PSN1 and MIAPaCa2) or metastatic (CAPAN1) tumors.

Methods. DTA was subcloned in an eukariotic expression vector (pRc) under the control of a constitutive promoter (RSV). Chemical transfection (Lipofectamine 2000) efficiency was evaluated by FACS analysis, using a FITC-oligonucleotide as tracer. Transcription efficiency was evaluated by FACS analysis and western blotting using a reporter gene (GFP) cloned in pRc. Study design was. 1. transfection of 250.000 cells for 6 h with 4 ug DNA; 2. after 24 h cells were seeded in quadruplicate in a 96-well plate; 3. cell growth was evaluated daily for 3 days by the cell viability XTT test. For each cell line two controls were run in parallel: lipofectamine only treated cells and cells transfected with the empty DNA vector (pRc). Results. More than 50% of cells were efficiently transfected. In four cell lines GFP transcription was recorded: CAPAN-1 did not translate the inserted gene. In agreement this cell line was resistant to DTA gene transfer. A complete growth inhibition was achieved after DTA gene transfer in BxPC3, PANC1, PSN1 and MIAPaCa2 in comparison with the two corresponding control cells (MANOVA: within and between subjects = $p < 0.0001$ for all cell lines).

Conclusions. DTA expression is lethal for pancreatic cancer cells and this supports the potential use of this toxin for pancreatic cancer gene therapy. The lack of gene translation found in CAPAN-1 cells, a metastatic cell line, might be consequent to the absence of specific transcription factors recognizing the RSV promoter.

204

PREVALENZA DI COMPONENTE MONOCLONALE DI ACCOMPAGNAMENTO IN DIFFERENTI PATOLOGIE

M. Falcone¹, S. Tappi¹, A. M. Celozzi¹, F. Simone¹, R. Antonetti¹

¹ 1° Lab. Analisi Cliniche - Dip. di Diagnostica di Laboratorio, A.O. Ospedali Riuniti di Foggia

Le richieste di E.P. sono numerose e talvolta anche urgenti per l'approccio agli esami contrastografici. A tal fine diviene importante l'evidenziazione delle CM. Il gran numero di E.P. eseguite porta a volte alla scoperta di una CM non attesa che pone interrogativi al clinico, poiché non sempre la CM correla con uno stato di malattia. Inoltre la maggior parte delle CM sono di piccole dimensioni e ciò porta o a trascurarla o ad approfondire le indagini. Nella pratica non mancano casi eclatanti: paziente con IgD in beta2; CM di cat. L in b2. Entrambi con diagnosi di MM. Ma non sempre è possibile trovare una patologia correlata alla CM e ci si può chiedere: le CM possono avere un altro significato clinico, correlate con differenti patologie non attese?

Scopo del lavoro. Valutare la prevalenza delle CM in alcuni Reparti.

Metodi e Risultati. Sono stati esaminati 1390 pazienti e 572 donatori di sangue nella seconda metà del 2006. I pazienti provenivano da: Medicina, Cardiologia, Malattie Infettive, Ematologia. La suddivisione per classi di età mostrava un numero maggiore di pazienti all'aumentare dell'età, non per i donatori. Le prevalenze suddivise per reparto sono riportate: (n.paz/n.CM/prev %) Card./U.Cor. 211/9/ 4,27%; Medicina 464/31/6,68%; Mal.Inf. 545/43/7,89%; Ematologia 170/40/23,53%; SIT (don.) 572/3/0,52%; tot. paz. 1962/126/6,42%.

Sono risultate tipizzate 90 CM così suddivise: (CM %): IgGK 36,7; IgGL 22,2; IgAK 10; IgAL 7,8; IgMK 14,4; IgML 3,3; K 2,2; L 3,3.

Conclusioni. La prevalenza è minima tra i Donatori e massima tra i pazienti ematologici, come era da attendersi. Per gli altri reparti si osserva che più le patologie coinvolgono l'immunità, o per attacchi specifici infettivi o per insulti autoimmunitari nelle patologie croniche, più aumentano le CM. La prevalenza è bassa in Cardiologia, molto probabilmente per un minor interessamento dell'immunità. All'aumentare dell'età accrescono le CM, ciò è stato osservato per ogni reparto. Questo primo approccio non ha risposto, se non parzialmente al quesito, ulteriori studi sono indispensabili per poter svelare ciò che ancora nasconde l'evidenziazione all'E.P. di una CM.

205

ANALISI PROTEOMICA DELLA IMMUNOREATTIVITÀ DELLE ISOFORME DELL'APTOGLOBINA IN FUNZIONE DEL DATO NEFELOMETRICO

R. Guerranti², E. Bertocci², C. Muzzi², S. Petralia¹, M. Salvi¹, R. Pagani²

¹DAI Medicina di Laboratorio, U.O.C Laboratorio Analisi Cliniche, AOUS, Siena

²Dpt. Medicina Interna, Sc. Endocrino Metaboliche e Biochimica, Università degli Studi di Siena

Obiettivi. Le catene α e β dell'aptoglobina (Hpt) sono entrambe caratterizzate da molti spots evidenziabili tramite elettroforesi bidimensionale (2D-E). Abbiamo confrontato tramite 2D-E, il pattern completo di tutti gli spots dell'Hpt e la loro immunoreattività con gli anticorpi usati in nefelometria. Sarà possibile confrontare la variazione dell'espressione di ciascuno spot con la sua specifica immunoreattività.

Metodi. I plasmi di 10 pazienti con valori variabili di Hpt determinati nefelometricamente, sono stati analizzati in doppio tramite 2D-E (isolettrofocalizzazione a pH 4-7, strip 7 cm, SDS-PAGE 12%). Per ogni campione 1 gel è stato colorato con nitrato di argento e sull'altro è stato effettuato un blot con anti-Hpt.

Risultati. Tramite 2D-E e successiva rivelazione con nitrato di argento è stato possibile evidenziare almeno 12 spots per le catene β e 3 spots per le catene ALFA. Per ogni spot è stata determinata la relativa percentuale e, in base al valore nefelometrico di Hpt, ne abbiamo calcolato la concentrazione. Dall'analisi effettuata su tutti i pazienti risulta che vi è un'omogenea distribuzione dell'Hpt sui vari spot e una buona correlazione fra il valore di ogni spot e quello totale di Hpt. Se però la rivelazione viene effettuata tramite rivelazione immunologica, la distribuzione dell'Hpt sui relativi spots cambia e non tutti vengono rivelati.

Conclusioni. Risulta evidente che non tutti gli spots dell'Hpt hanno la stessa reattività con l'anti-Hpt. Poiché il dato nefelometrico si basa sul valore globale, non vi sono problemi fino a che le percentuali di ogni spot sono costanti nella popolazione e indipendenti sia dal valore totale di Hpt che da eventuali patologie. Quindi, in tutti i casi in cui la letteratura riporti la specifica alterazione di alcuni spots (Ferrero et al., 2005), sarà opportuno analizzarne la reattività con l'Ab, poiché nel caso in cui questi spots rappresentassero una percentuale importante fra tutte le isoforme dell'HP, ciò porterebbe inevitabilmente ad una determinazione errata del valore totale di HP.

Bibliografia. Ferrero S., Gillott D.J., Remorgida V., Anserini P., Price K., Ragni N., and Grudzinskas J.G.(2005). Fertility and sterility. 83;5:1536-43.

206

DETERMINATION OF CARBOHYDRATE-DEFICIENT TRANSFERRIN IN HUMAN SERUM USING THE BIO-RAD %CDT BY HPLC TEST

A. Helander¹, J. Bergstron¹

¹Karolinska University Hospital Solna, Alcohol Laboratory, L7:03

Sustained, heavy alcohol consumption alters the transferrin glycosylation profile in blood by increasing the amounts of disialotransferrin and asialotransferrin. The alcohol-related glycoforms are collectively called carbohydrate-deficient transferrin (CDT). Measurement of %CDT (relative amount to total transferrin) is widely used for identifying individuals with alcohol problems in various clinical settings. This study evaluated the performance of a new commercial method for CDT, the Bio-Rad %CDT by HPLC test.

The Bio-Rad %CDT test measures the relative amount of transferrin glycoforms to total transferrin from peak areas using baseline integration. Glycoforms are separated on a gradient HPLC system, followed by specific measurement of the iron-transferrin complex at 460 nm. %CDT is defined as the sum of asialo-, monosialo- and disialotransferrin and the proposed upper 95% confidence limit is 1.7%. Comparison was made with an HPLC candidate reference method on an Agilent 1100 LC system. The samples used were two human serum pools (low/high disialotransferrin), 150 clinical surplus sera with 0.7-22.4% disialotransferrin, and 18 genetic transferrin variants.

The Bio-Rad %CDT test allowed reproducible separation and quantification of transferrin glycoforms in about 6 min (total analysis time about 10 min). Genetic transferrin variants known to cause falsely high or low results with the minicolumn %CDT immunoassays were readily identified. The detection limit was about 0.1%. The total CV for the low and high serum pool was 8.5% and 4.3%, respectively. For the 150 sera, the relative amounts of disialotransferrin were in good agreement with the results of the candidate reference method ($r^2=0.998$, $p<0.0001$, slope 0.987, intercept -0.21). The asialotransferrin values were also highly correlated ($n=39$, $r^2=0.949$, $p<0.0001$). All serum samples with a measurable asialotransferrin by the Bio-Rad %CDT test showed elevated disialotransferrin values (>1.9%).

In conclusion. The Bio-Rad %CDT by HPLC test is appropriate for routine as well as confirmatory testing of %CDT in samples of human serum, with the added advantage over previous HPLC methods of an improved, single-step serum sample pretreatment and a shorter total analysis time.

207

CLASSIFICAZIONE DELLE PROTEINURIE: CONFRONTO TRA ELETTROFORESI CAPILLARE E IN GEL DI AGAROSIO

I. Infusino¹, P. Luraschi¹, M. Panteghini¹, C. Franzini¹

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. L. Sacco, Milano e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano

La elettroforesi capillare (CZE) è stata recentemente proposta come una nuova tecnica per la valutazione delle proteinurie e la ricerca e tipizzazione della proteina di Bence Jones (BJP). Scopo di questo lavoro è stata la valutazione della capacità di classificazione delle proteinurie mediante CZE confrontata con quella ottenuta mediante elettroforesi su gel di agarosio (AGE). Sono stati selezionati 166 campioni di urina, con differenti tipologie di proteinuria [fisiologica (PF), 27; albuminuria (ALB), 33; glomerulare selettiva (GS), 31; non selettiva (GNS), 8; tubulare (PT), 2; mista (PM), 39; BJP, 26] sulla base del dato routinario. Oltre al quadro elettroforetico, ottenuto mediante AGE (Protur Hisi, Beckman) e CZE (CZE Paragon 2000, Beckman), i campioni sono stati sottoposti a misura immunometrica (Image, Beckman) di immunoglobuline G, transferrina, proteina legante il retinolo, α 1-microglobulina e albumina, oltre che a misura della concentrazione di proteine totali. Per i campioni con BJP, si è inoltre proceduto alla tipizzazione mediante immunofissazione (Twin IFE, Beckman) e immunosottrazione (CZE Paragon 2000). 142 campioni (86%) hanno mostrato concordanza di classificazione tra AGE e CZE. In particolare, tutte le BJP erano correttamente evidenziate con entrambi i sistemi. In 24 casi (14%) si evidenziava una discordanza nella capacità classificativa dei due metodi. Per questi campioni, si è proceduto ad una classificazione indipendente della proteinuria sulla base delle concentrazioni urinarie delle proteine specifiche, utilizzando questa come "gold standard" nella comparazione. In 14 casi si evidenziava una concordanza tra CZE e "gold standard", mentre questo avveniva solo in tre casi per AGE: un caso di GNS classificato come GS da CZE e due PM classificati come GS e PT da CZE. Di 4 casi riclassificati definitivamente come PF, due erano correttamente classificati da CZE mentre in tutti i casi AGE identificava quadri patologici. Dai dati ottenuti si può concludere che la capacità classificativa delle proteinurie mediante CZE è almeno sovrapponibile, se non migliore, di quella ottenuta con metodiche tradizionali in AGE.

208

DECHLORINATION OF PROTEINS: A NOVEL MECHANISM AGAINST MPO-DEPENDENT PROTEIN OXIDATIONS. Ippolito¹, A. Mani¹, K. Moore¹¹*The UCL Institute of Hepatology, Department of Medicine, Royal Free & University College London, London, United Kingdom*

The inflammatory response and the pathogenesis of cardiovascular diseases have been associated with activation of myeloperoxidase (MPO), key enzyme of inflammation. The measurement of 3-chlorotyrosine (CT) has extensively been used to assess formation MPO derived reactive species in vivo (1). However, one of the major disadvantages of measuring CT is that chlorinated proteins are broken down and the resulting free CT is taken up by cells, metabolized and excreted.

Aims. To identify the major metabolic pathways responsible for CT metabolism and to develop mass spectrometric methods for measurement of the urinary metabolites of CT.

Methods. Deuterium-labelled CT (D4-CT) was synthesized by deuterium exchange. D4-CT (0.5 umole) was injected intra-peritoneally into Sprague-Dawley rats (n=4) and 24 h urine collected using a metabolic cage. C13 labelled derivatives of tyrosine (Tyr) and its urinary metabolites were synthesized and used as internal standards for quantitation. Following solid phase extraction, urine samples were derivatized to the pentafluorobenzyl ester, and analysed by isotope dilution gas chromatography by negative ion chemical ionization mass spectrometry.

Results. 3-chloro-4-hydroxyphenylacetic acid (CHPA) was identified as the major chlorinated metabolite of CT. However CHPA only accounted for 3.6 ± 0.3 % of infused D4-CT. The striking observation was that ~40% of infused D4-CT was excreted in the urine as the dechlorinated derivative, para-hydroxyphenylacetic acid, which is a urinary metabolite of Tyr. D4-tyrosine was also excreted in the urine and accounted for 1.1 ± 0.1 % of infused D4-CT. To determine whether dechlorinase activity is present in liver tissue, D4-CT (40 umol/l) was incubated with rat liver homogenate in vitro. This led to the time-dependent formation of D4-Tyr. To test whether protein-bound CT could be substrate of de-chlorinase activity; chlorinated-albumin was incubated with rat liver homogenate obtained from analbuminemic rats. This also led to a significant reduction in CT/Tyr ratio in the albumin band following SDS-PAGE electrophoresis.

Conclusion. De-chlorination of CT to Tyr is the major metabolic pathway to eliminate chlorinated Tyr in rats.

Reference. Hazen SL et al. *Free Radic Biol Med* (1997)23:909-916

209

EVALUATION OF A METHOD BASED ON IMMUNONEPHELOMETRY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF CARBOHYDRATE-DEFICIENT TRANSFERRIN (CDT)A. Liverani¹, M. Mussap², M. Zaninotto¹, M. C. Varagnolo¹, M. Plebani¹¹*Dip. Med di Lab., Az. Osp. di Padova, Padova*²*U.O. di Lab., Osp. San Martino, Genova*

Introduction. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) is currently considered the best available marker for the diagnosis of chronic alcohol abuse. CDT consists of transferrin (Tf) isoforms containing di-, mono- and asialylated carbohydrate chains in its structure. It has been estimated that a consumption of 50-80g alcohol/day for at least 1 week is needed to increase the blood CDT concentration. Currently the determination of CDT is performed using anion-exchange chromatography followed by immunoassay, isoelectric focusing, anion-exchange liquid chromatography, mass spectrometry.

Materials and Methods. The evaluation was carried out on 201 serum samples analysed by an immunonephelometric method on BN II System (Dade Behring, Glasgow, USA) and on Capillarys System (Sebia, Florence, Italy) currently in use by us; 46 samples was also analysed on P/ACE MDQ (Beckman-Coulter Fullerton U.S.). On BN the CDT is detected by a competitive assay using specific monoclonal antibodies. The higher the CDT content in the sample, the lower the scattered light signal. The other capillary electroforetic techniques are based on the separation of charged molecules by their electrophoretic mobility in an alkaline buffer; Tf isoforms are detected directly at 200 nm. In all methods, results are expressed as percentage of CDT relative to total Tf. The evaluation consisted of: within- and between-run imprecision studies, variants repetition, effects of interfering substances, methods comparison.

Results and Conclusions. Within - and between-run imprecision (CV%) were 10.1% and 11.7% at low CDT levels (1.95%, 1.27%) and decrease (4.6% and 7.5%) as CDT levels increase (2.37%, 2.41). 155 samples had 94.8% agreement with Capillarys (CE), while 46 samples gave no results on CE for the presence of genetic variants or interfering substances (bilirubin, triglycerides, monoclonal components). These samples were analysed on MDQ showing 81.6% agreement with BN on 38 getting results. No interferences were observed on BN. Methods comparison was evaluated by linear regression and Bland Altman analysis showing this correlation: $BN = 0.841CE + 1.241$ ($r = 0.804$); Bias (95% CI) = -1.11 ($-1.167/-1.052$).

In conclusion. BN assay shows satisfactory performance allowing to clarify some critical samples at CE.

210

IL DOSAGGIO DELLA CISTATINA C NEI BAMBINI NEFROPATICI

A. Maglione¹, R. Catapano¹, G. Di Pascale¹, B. Pennucci¹, L. Picone¹, A. Torlo¹, A. De Rosa¹

¹S.C. Lab. di Patologia Clinica, Osp. Santobono, Napoli

La Cistatina C (CysC) è una proteina a basso peso molecolare prodotta dalle cellule nucleate dell'uomo. Nel rene è completamente filtrata dal glomerulo e quasi totalmente riassorbita e catabolizzata dal tubulo contorto prossimale. Le suddette caratteristiche, insieme al fatto che la sua concentrazione ematica non ha variazioni significative rispetto a sesso, età, dieta e massa muscolare, ne fanno un ideale marcatore endogeno della velocità di filtrazione glomerulare (GFR).

Obiettivo. Il nostro scopo è stato quello di valutare se in soggetti di età pediatrica il dosaggio ematico della CysC fornisca indicazioni cliniche più efficaci di quelle dedotte dalla classica Clearance della Creatinina (Ccr).

Materiali e Metodi. Lo studio è stato condotto su 483 bambini (174 maschi e 209 femmine) suddivisi in 6 gruppi di cui 1 comprendeva soggetti sani e gli altri 5 costituiti da pazienti con differenti patologie renali. Per tutti sono stati determinati: la superficie corporea (misurando peso e altezza), la Ccr ed i livelli sierici di CysC. Il dosaggio della Creatinina è stato eseguito su un analizzatore Olympus AU 640 con il metodo colorimetrico cinetico di Jaffè mentre per quello della CysC si è utilizzato uno strumento BN II - Dade Behring ed un metodo immuno-nefelometrico.

Risultati. I valori della Ccr, normalizzati in base alla superficie corporea, e quelli della CysC hanno evidenziato una soddisfacente correlazione sia sul totale delle determinazioni che all'interno dei singoli gruppi.

Conclusioni. La CysC risulta essere un indicatore della GFR valido almeno come la Ccr, ma il suo dosaggio risulta vincente, soprattutto in campo pediatrico, perché non è influenzato dalla superficie corporea e dalla dieta; inoltre non occorre la raccolta delle urine (sempre difficoltosa nei bambini piccoli), né l'utilizzo di calcoli matematici o formule empiriche (fonti di ulteriori imprecisioni).

Bibliografia. Mussap M, Plebani M Crit Rev Clin Lab Sci. 2004;41(5-6):467-550.

211

DOSAGGIO DELLA TRANSFERRINA DESIALATA (CDT) IN ELETTROFORESI CAPILLARE

R. Maiavacca¹, M. Angeli¹, I. Felicetta¹, M. G. Ratti¹, M. G. Meroni¹, E. Torresani¹

¹Laboratorio di Patologia Clinica, Fondazione Policlinico, Mangiagalli, Regina Elena, Milano

Il dosaggio della transferrina desialata (CDT) viene utilizzato come marcatore di abuso alcolico cronico con valenza medico legale. Il nostro Laboratorio esegue il dosaggio della CDT in elettroforesi capillare (CAPILLARYS SEBIA) che ottiene la separazione delle isoforme della transferrina in modo automatizzato, con alta velocità di analisi e buona risoluzione. Le richieste provengono dalla Medicina del Lavoro per identificare l'abuso alcolico negli autisti al momento dell'assunzione e durante le visite periodiche di idoneità. Preliminarmente è stata effettuata la validazione del metodo: ripetibilità nella serie cv 4.5%; ripetibilità tra giorni cv 5.6%; linearità fino a 5.2% (valore più alto finora riscontrato). Come popolazione normale abbiamo esaminato 50 maschi (32-58 anni) e 50 femmine (21-64 anni) con anamnesi negativa per potus, tests di funzionalità epatica e transferrina nella norma. Il dosaggio della CDT è risultato 0.65 ± 0.18 per i maschi e 0.59 ± 0.14 per le femmine. I due gruppi di valori non sono statisticamente diversi e si posizionano entrambi ben al di sotto dei valori considerati patologici. In sei mesi sono stati sottoposti a dosaggio di CDT 364 soggetti. Considerando come cut-off il valore di 1.3%, in 8 soggetti si sono ottenuti risultati patologici, 7 con valori tra 1.3 e 1.6% e 1 con valore di 5.2% e presenza della frazione asialo. Tutti i valori sono stati riconfermati su di un campione successivo. In 6 soggetti la presenza di varianti della transferrina interferiva nel dosaggio della CDT. In 2 soggetti con componenti monoclonali, una IgAK non interferiva con il dosaggio della CDT, una IgGK si sovrapponeva alla frazione disialo, dosabile dopo trattamento con soluzione deproteinizzante. Nei soggetti con valore di CDT patologico non si è riscontrata correlazione positiva con i valori di gammaGT. Possiamo dire che il dosaggio della CDT in elettroforesi capillare con CAPILLARYS sta dando risultati incoraggianti date le buone prestazioni del metodo e l'elevata specificità della CDT come marcatore di abuso alcolico cronico.

Torsten Arndt: Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis and interpretation Clin Chem 47:1 13-27 2001

212

CONTENUTO SPECIFICO DEL FERRO DELLA FERRITINA IN PAZIENTI IPERFERRITINEMICI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO CRONICO: CONFRONTO CON I PAZIENTI SETTICI E SOGGETTI EMOCROMATOSICI

C. Rossi¹, B. Bocca⁴, P. L. Spada², B. M. Ricerca³, V. Cozza², G. Bruno¹, A. Alimonti⁴, P. De Sole¹

¹Lab. di Biochimica Clinica, Pol. A. Gemelli, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Ist. di Chirurgia, Pol. A. Gemelli, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

³Ist. di Ematologia, Pol. A. Gemelli, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

⁴Istituto Superiore di Sanità, Roma

Scopo. Nei soggetti con insufficienza renale cronica in trattamento emodialitico, nonostante l'utilizzo dell'eritropoietina, non è infrequente osservare significativi livelli di anemia anche in condizioni di iperferritinemia; condizione questa che pone, dal punto di vista terapeutico, non pochi problemi sull'opportunità della terapia marziale.

In un precedente lavoro (1), è stato analizzato il contenuto specifico del ferro della ferritina di un gruppo di pazienti in trattamento emodialitico cronico con diversi livelli di ferritinemia. Il principale risultato ottenuto evidenzia una correlazione inversa tra il ferro della ferritina (n. atomi Fe/mole ferritina) e ferritinemia (mg/L). Poiché in questi soggetti la ferritinemia non correla con indici di infiammazione, nel presente lavoro ci proponiamo di confrontare il contenuto specifico di ferro della ferritina di soggetti iperferritinemici in emodialisi cronica con quello di soggetti in condizioni di sepsi gravi o con emocromatosi.

Metodi. 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 antiferritina 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 e Conclusioni. I risultati principali che ci si propone di ottenere con queste determinazioni sono:

- 1) caratterizzare meglio la iperferritinemia di soggetti in emodialisi cronica in rispetto a quella presente in soggetti con sepsi o in soggetti emocromatosi da condizioni di elevato contenuto totale di ferro del soggetto;
- 2) identificare sottopopolazioni di soggetti iperferritinemici in emodialisi cronica con alto e basso contenuto specifico di ferro allo scopo di definire i pazienti che necessiterebbero di un trattamento marziale (Fe ed EPO) nonostante la condizione di iperferritinemia;
- 3) contribuire ad una migliore definizione del ruolo fisiologico della ferritina.

Bibliografia. Biochimica Clinica 2005, 29, pag. 241

213

CORRELATION BETWEEN TWO METHODS OF MEASURING GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY IN DIFFERENT HUMAN BIOLOGICAL SOURCES

V. Sedda¹, R. Accinni¹, C. Della Noce¹, S. Ippolito², M. Rosina²

¹Institute of Clinical Physiology, CNR, Ca' Granda Hospital, Piazza Ospedale Maggiore, 3, 20162 Milan, Italy

²Department of Medical Science, University of Milan, Ospedale Maggiore-IRCCS, 20122 Milan, Italy

Background. Several data support glutathione peroxidase (GPx) as the scavenger enzyme of choice for diagnosis, screening and monitoring of antioxidant status in pathological conditions. However, regarding its measurement, several studies based on the same spectrophotometric principle used different reagents and sampling procedures.

Aim. The study was designed to compare the commercially assay RANSEL (Kit Randox) with the method described by Paglia et Valentine (1), modified by our laboratory in different biological sources.

Methods. GPx activity was measured using both methods in these following samples: human blood (n = 36), whole blood for Ransel and washed erythrocytes for our method, plasma (n = 20) and hepatic tissue (n = 29). RANSEL determination was performed according to the technical kit insert. Our method was based on the one described in literature (1) except for tert-butyl hydroperoxide as substrate in place of hydrogen peroxide. A Clinical chemistry photometric analyser (Daytona System) was used for both methods (C.V. were 7.5% and 6.4 for Ransel and our method respectively).

Results. The two methods showed a moderate correlation (r=0.70, p=0.001) in blood samples analysis. On the contrary a high correlation was found for plasma determination between the two methods (r=0.79; p <0.0001). Tissue determination was sample concentration dependent [in terms of gram of protein (grp), median value for samples = 5.94 grp]. Methods correlated significantly in tissue containing less than 5.94 grp (r=0.81, p<0.0001, n=15); conversely, for sample with more than 5.94 grp only a moderate correlation was found (r=0.65, p=0.01, n=14).

Conclusions. The results demonstrate that the kind and the sampling procedures may affect GPx determination in blood measurements. Plasma sample preparation is the same for both methods, reflecting the high correlation found, but the tissue determination need to be defined in terms of concentration. In fact a significant correlation was found only for tissue containing lower grp.

References. Paglia DE. and Valentine WN., Studies on the quantitative and characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab & Clin Med 70(1):158-168,1967.

214

PUNTUALIZZAZIONE SULLA RACCOLTA URINARIA NEL CASO DI RICERCA DELLA PROTEINA DI BENGE JONES

M. Tani¹, A. Ciapini², B. Milanese¹

¹Servizio Patologia Clinica- A.O. "Desenzano del Garda"

² già Direttore Sebia, Italia

Gli Autori affrontano in questa comunicazione aspetti correlati con la interpretazione di quadri elettroforetici il cui valore è paragonabile con quello della semeiotica clinica. In particolare, in caso di riscontro di ipogammaglobulinemia, ovvero di rarefazione della densità in regione gamma, è doveroso procedere all'inquadramento poiché possono essere associate gravi ed inaspettate patologie (linfomi, mieloma, amiloidosi ecc.) rivalutando la diagnostica elettroforetica oltre il riscontro delle componenti monoclonali.

Utilizzando un caso clinico che potremmo interpretare come paradigmatico, gli Autori propongono un algoritmo diagnostico in caso di riscontro di ipogammaglobulinemia ed aggiungono considerazioni relative allo studio, alla ricerca della Proteina di Bence Jones nelle urine.

Dalla casistica raccolta (tre casi di mieloma micromolecolare) emerge che tale proteinuria è di tipo continuo, ma con caratteristiche di intermittenza rispetto alla quantità escreta con una apprezzabile acrofase nelle ore del mattino, suggerendo di utilizzare nelle fasi di ricerca il secondo campione del mattino, senza ricorrere alla diuresi delle 24 ore utilizzabile invece qualora si richieda al laboratorio una valutazione quantitativa della proteina stessa.

215

AMILASI PANCREATICA VS. AMILASI TOTALE: RELAZIONE FRA IMPIEGO DEL TEST E OUTCOME

C. Valente¹, R. Dominici¹, M. Panteghini¹

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. L. Sacco, e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano

A partire dall'ottobre 2005 è stata introdotta nel nostro Ospedale la determinazione nel siero dell'isoenzima pancreatico dell'amilasi (P-AMY) a sostituire completamente quella dell'amilasi totale (T-AMY) nel siero e nelle urine per la diagnosi ed il monitoraggio della pancreatite acuta. A 6 mesi dal cambiamento, abbiamo voluto valutare le sue ricadute in termini di numero di esami eseguiti, costi e benefici clinico-diagnostici. A tal fine sono stati confrontati i periodi riguardanti il semestre ottobre 2005-marzo 2006 (periodo di attivazione della P-AMY; S2) ed il semestre ottobre 2004-marzo 2005 (periodo corrispondente di utilizzo esclusivo della T-AMY; S1). Il numero degli esami eseguiti (S2 vs. S1) si è significativamente ridotto, sia in regime ordinario (-5,7%) che in urgenza (-24,8%), con una riduzione totale del numero di esami, calcolata su base annua, pari a circa 9.500. Non essendo variato il numero dei ricoveri, sembra ipotizzabile che la richiesta di determinazione della P-AMY possa essere in qualche modo più legata ad una motivazione clinica (es. diagnosi differenziale dell'addome acuto) correlata ad un possibile coinvolgimento del pancreas. Dal momento che il costo unitario per esame è leggermente maggiore per la P-AMY (€ 0,97) rispetto alla T-AMY (€ 0,72), si è registrato un lieve aumento dei costi/reagente, pari a € 6.450 su base annua. A questo fa però da contraltare la eliminazione dei risultati falsi-positivi dovuti alla aspecificità della T-AMY, stimata mediamente del 12%(1). Sulla base del numero di P-AMY eseguite annualmente in urgenza (22.500), è stato possibile stimare questa entità in 2700 risultati/paziente, sui quali si può ipotizzare un significativo risparmio in procedure diagnostiche di conferma (es. ecografia addome superiore). In particolare, assumendo arbitrariamente in € 50 il risparmio pro-capite in procedure di conferma, è ipotizzabile un risparmio totale di € 135.000 su base annua. I risultati del nostro studio rappresentano un esempio di come le attività nel Laboratorio Clinico debbano essere considerate e valutate non limitatamente al semplice costo per test, ma più appropriatamente per il loro impatto in termini di economia sanitaria.

Bibliografia. Panteghini M, Ceriotti F, Pagani F, et al. Clin Chem Lab Med 2002;40:97.

216

CONFRONTO TRA DUE METODI PER LA RICERCA DELLA PROTEINA DI BENICE JONES: ELETTROFORESI ED IMMUNOSOTTRAZIONE CON TECNICA CAPILLARE ED IMMUNOFISSAZIONE SU GEL DI AGAROSIO

S. Pelliconi¹, L. Pezzi¹, R. Nunziatini¹, A. Vernocchi¹

¹Laboratorio Analisi, Ospedale Morgagni Pierantoni, Forlì

Scopo dello studio è la comparazione tra l'elettroforesi capillare seguita da immunosottrazione sullo strumento Paragon CZE 2000 e l'immunofissazione su gel d'agarosio eseguita sullo strumento Hydrasys per la ricerca della proteina di Bence Jones nelle urine.

Casistica. Sono stati selezionati 100 campioni di urina conservati a 4°C con aggiunta di sodio azide, positivi per la presenza della proteina di Bence Jones.

Le componenti monoclonali rilevate con elettroforesi capillare sono state confermate e tipizzate mediante immunosottrazione ed immunofissazione.

Materiali e Metodi. Per ogni campione una aliquota di 0,5 ml è stata pretrattata con un procedimento di desalficazione, con l'utilizzo di una colonna Amersham Sephadex, previamente lavata con soluzione desalficante.

Gli eluati così ottenuti, dopo l'aggiunta di 0,7 ml di soluzione desalficante, sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare e ad immunosottrazione su CZE con appositi kit.

Gli stessi campioni non trattati e non concentrati sono stati sottoposti ad immunofissazione su gel di agarosio (Hydrasys). Dopo la separazione elettroforetica su gel d'agarosio, le proteine urinarie sono incubate con antisieri specifici (anti IgG, IgA, Alfa 1 microglobulina, catene Kappa e Lambda) stratificati sulle apposite corsie di migrazione, e dopo la fissazione i complessi antigene-proteina vengono colorate con acido violetto e rese evidenti ad una lettura visiva o tramite scanner.

Risultati. Tutte le elettroforesi eseguite su CZE e su gel di agarosio hanno evidenziato la presenza nei 100 campioni della Proteina di Bence Jones. La tipizzazione con immunosottrazione ed immunofissazione ha evidenziato una concordanza del 98%. Solo 2 campioni infatti, anche se positivi per la presenza della proteina di Bence Jones con entrambi i metodi, sono risultati discordanti, relativamente alla loro tipizzazione.

Conclusioni. I risultati ottenuti dimostrano una buona corrispondenza tra i metodi e una loro soddisfacente sensibilità nel rilevare la presenza nelle urine di Proteina di Bence Jones anche a basse concentrazioni.

217

DETERMINAZIONE DI TAU, p-TAU E BETA AMILOIDE 1-42 IN PAZIENTI AFFETTI DA ALZHEIMER E DEMENZA FRONTOTEMPORALE

M. Zabeo¹, F. Rispoli¹, M. Cannone¹, M. Barberis¹, F. De Rino², M. Zuffi², O. Pelati², S. Castiglioni², M. Franceschi²

¹MultiLab, Multimedita Holding, Milano

²Dipartimento di Neurologia, S. Maria, Castellanza, Varese

La malattia di Alzheimer (AD) è la più comune forma di demenza e la sua diagnosi clinica differenziale è spesso difficile nei confronti della demenza fronto-temporale (FTD). La determinazione di Tau, p-Tau e β amiloide₁₋₄₂ (β A42) in campioni di liquor cerebrospinale (CSF) e la ricerca del genotipo Apo E sembrano fornire un valido aiuto alla clinica.

Scopo. Determinazione di Tau, p-Tau e β A42 in campioni di CSF, prelevato con puntura lombare, provenienti da soggetti affetti da AD e/o FTD clinicamente determinate.

Campione. 30 campioni di liquor da soggetti con probabile AD (criteri NINCDS-ADRDA) e 15 da soggetti con probabile FTD (criteri di Neary). La determinazione quantitativa di Tau, p-Tau e β A42 è stata effettuata per mezzo di test Elisa (Innotest, Innogenetics, Ghent, B).

I risultati ottenuti sono stati analizzati sia singolarmente sia in combinazione grafica: IATI vs pTau con IATI (INNOTEST Amyloid Tau Index, β A42(240+1.18xhTau). In 17 pazienti affetti da AD è stato determinato il genotipo Apo E.

Risultati. L'analisi grafica ha confermato la clinica di AD in 23/30 casi (Sensibilità:77%, Specificità:70%, PPV:79.3%, PNV:66.7%). Il sospetto clinico di AD è stato confermato dai genotipi E3/E4 e E4/E4 in 8/17 casi (47%), concordanza con il dato liquorale nel 29% dei casi. La clinica di FTD è stata confermata solo in 6/15 casi (Sensibilità:40%, Specificità:41%). Soggetti con AD hanno mostrato una riduzione prossima alla significatività di β A42 se confrontati con pazienti affetti da FTD (p=0.056). I dati ottenuti suggeriscono il rapporto β A42/pTau come significativo per discriminare AD da FTD (p=0.019).

Conclusioni. I dati ottenuti, sebbene su un numero ridotto di campioni, suggeriscono che i test Tau, p-Tau e β A42 su liquor sono valido supporto alla clinica nella diagnosi di AD o per escludere AD nel caso di sospetta FTD; scarsamente significativa ai fini diagnostici è stata la determinazione di Apo E. Il rapporto β A42/pTau sembra essere il parametro migliore per discriminare AD da FTD, tuttavia il numero ridotto di osservazioni non permette di trarre affermazioni conclusive.

218

ACIDI BILIARI NELLA SALIVA COME MARKER DI MALATTIA DA REFLUSSO FARINGO-LARINGEO

S. Baroni¹, E. De Corso², C. Carrozza¹, G. Mascagna¹, F. Romitelli¹, J. Galli², G. Paludetti², C. Zuppi¹

¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, UCSC, Policlinico A. Gemelli, Roma

²Istituto di Otorinolaringoiatria, UCSC, Policlinico A. Gemelli, Roma

L'effetto dannoso svolto dal reflusso duodeno gastro-esofageo (DGER) sulla mucosa delle vie digestive superiori è noto da tempo. La frequente incidenza di carcinoma del laringe in pazienti sottoposti a gastroresezione ha indotto ad ipotizzare che il reflusso biliare possa rappresentare uno stimolo cronico infiammatorio e/o degenerativo anche a livello dei distretti faringo-laringei. Abbiamo quindi pensato di ricercare la possibile presenza di acidi biliari e bilirubina nella saliva di soggetti gastroresecati, come markers biochimici di reflusso biliare e di valutare se la loro presenza fosse correlata con lesioni degenerative laringee.

Soggetti Studiati. 52 pazienti gastroresecati e 45 volontari sani, omogenei per età e sesso.

Campioni. La saliva era raccolta alle ore 8 mediante "salivette", stoccata in aliquote dopo centrifugazione e congelata a -80° C fino al momento del dosaggio.

Metodi. Acidi biliari totali con kit enzimatico colorimetrico Sentinel, automatizzato su Olympus, modificando la curva di calibrazione (a 4 punti - range 0-5.0 umol/L). Come controllo è stato utilizzato lo standard Sentinel (4.3 umol/L) diluito fino a 0.3 umol/L (CV intra-assay 5%). Bilirubina con kit colorimetrico Olympus.

Risultati. Abbiamo trovato presenza sia di acidi biliari (1.1 +- 0.3 umol/L) che di bilirubina (0.11 +- 0.05 mg/dl) nelle salive di 17/52 gastroresecati. Gli acidi biliari e la bilirubina erano invece indosabili in tutti gli altri pazienti e nei controlli. La percentuale da noi osservata di gastroresecati positivi per acidi biliari (32.6%) concordava con l'incidenza di DGRE dopo gastroresezione (5-35%) riportata in letteratura. Inoltre abbiamo evidenziato (dati anamnestici ed endoscopici) una significativa incidenza di flogosi e/o cancerosi laringea nei pazienti gastroresecati con dosaggi salivari positivi per reflusso rispetto a quelli con dosaggi negativi.

Conclusioni. Il dosaggio degli acidi biliari nella saliva può essere considerato un marker semplice, specifico ed economico di DGRE e permetterebbe di selezionare soggetti con maggior rischio di lesioni croniche del laringe.

Bibliografia. Cammarota G, Galli J, De Corso E, Paludetti G and Maurizi M. Association of laryngeal cancer with previous gastric resection. *Ann Surg* 2004;240:817-824.

219

VITAMIN A, E, D, B COMPLEX AND HOMOCYSTEINE PLASMA LEVELS IN PATIENTS WITH ALZHEIMER DISEASE

G. Bivona¹, L. Carubia¹, E. Guglielmini¹, L. Ferraro¹, M. Ciaccio¹

¹Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction. Several studies suggest that an important role is played by oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer Disease. Alzheimer Disease is a multi-factor pathological condition on which onset and progression nutritional status may play a role. A deficiency in essential nutrients, such as A, E and B complex vitamins, have been recently associated with cognitive impairment in old age (1).

The aim of our study was to determine vitamins A, E, D, B6, B12 and homocysteine plasma levels in patients with Alzheimer Disease.

Material and Methods. Vitamin A, E, D, B6, B12 plasma levels were measured in 58 patients (28 males, age between 40-91 years; 30 females, age between 38-90 years) by High-Performance Liquid Chromatography; vitamin A and vitamin E were measured by UV detection at 280 nm, while B6 was measured by fluorescence detector; B12 and homocysteine values were obtained by autoanalyser Immulite System.

Results. Alzheimer patients showed vitamin A, D, E and B6 plasma levels significantly reduced (vitamin A: 0.16±0.06 mg/L, n.v.: 0.3-0.65 mg/L; vitamin D: 4.83±2.62 µg/L, n.v.: 20-120 µg/L; vitamin E: 3.51±0.83 mg/L, n.v.: 5-20 mg/L; vitamin B6: 2.54±0.94 ng/ml, n.v.: 4.3-17 ng/ml), while B12 vitamin was substantially in the normal range (B12: 438±61,52 pg/ml, n.v.: 174-878 pg/ml); homocysteine plasma levels were increased (20.7±5.1 µmol/L; n.v.: 11 µmol/L).

Conclusion. Alzheimer Disease is associated with an increased oxidative stress correlated with the depletion of antioxidant nutrients such as vitamin A, D and E. B complex deficiency can also result in hyperhomocysteinemia, a well known risk factor for atherosclerosis. Use of antioxidants in mild cognitive impairment could be of importance for prevention of Alzheimer Disease.

References. Salerno Kennedy R. et al., (2005) *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 75:83-95.

220

NITROSATIVE STRESS, CELLULAR STRESS RESPONSE AND THIOL HOMEOSTASIS IN PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE

V. Calabrese¹, R. Sultana², E. Guagliano¹, M. Sapienza¹, R. Bella³, A. Ravagna¹, J. Kinsky², G. Pennisi³, D. A. Butterfield², A. M. Giuffrida Stella¹

¹Department of Chemistry, University of Catania, Catania

²Department of Chemistry, University of Kentucky, USA

³Department of Neurology, University of Catania, Catania

Alzheimer's disease (AD) is a progressive disorder with synapse loss associated with cognitive and memory decline. Brains of AD patients undergo many changes, such as alteration of protein synthesis and degradation, classically associated with oxidative stress and heat shock protein induction, a 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 heme oxygenase (HO) in anti-degenerative mechanisms has received considerable attention, as it has been shown that HO induction by generating carbon monoxide and the potent antioxidant bilirubin, represents a protective system 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. We demonstrate in AD brain a significant increase in the expression of vitagenes HO-1, thioredoxin reductase (TRXr) and Hsp60, associated with a decrease in the expression of HO-2. Plasma GSH was decreased in AD patients, compared to the control group and was associated with a significant increase in oxidative stress markers, i.e., GSSG, hydroxynonenal, protein carbonyls and nitrotyrosine. Interestingly, a significant increase in the expression of TRXr was found in the prefrontal cortex but not in the cerebellum of AD brains, compared to controls. In AD lymphocytes we observed a significant increase in the expression of iNOS and of HO-1, Hsp70 and TRXr. Our data support a role for nitrosative stress in AD pathogenesis and indicate that therapeutic interventions focusing on the modulation of stress responsive genes, such as HO-1, may represent important targets for novel cytoprotective and antidegenerative strategies.

Reference. Calabrese V. et al. (2006) Antioxid Redox Signal. 8,404-416.

221

VALUTAZIONE DEL NUOVO KIT ROCHE PROLACTIN II: L'ESCLUSIONE DELLA MACROPROLATTINA È UN MIGLIORAMENTO DIAGNOSTICO?

C. Carrozza¹, S. Baroni¹, E. Di Stasio¹, S. Palumbo¹, C. Zuppi¹

¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica, Policlinico A. Gemelli

La prolattina (PRL) è un ormone peptidico che può circolare in diverse forme molecolari e subire modificazioni posttraslazionali; la più comune di queste isoforme è la macroprolattina (MPRL) che presenta minima attività biologica in vitro ma può interferire negli immunodosaggi determinando elevati livelli sierici di PRL non corrispondenti ad un quadro clinico da iperprolattinemia. I diversi dosaggi presenti in commercio mostrano una reattività alla MPRL variabile. Nel nostro laboratorio dal 2003 ad oggi la PRL è stata dosata con kit Roche attualmente non più distribuito perché risentiva della presenza di MPRL. Per questo motivo la nostra procedura prevedeva la refertazione di un avviso "possibile presenza di MPRL" e, su richiesta del clinico, la precipitazione con PEG 6000 di tutti i campioni con valori di PRL superiori a 50 ng/ml. Roche recentemente ha messo in commercio un nuovo kit (Prolactin II) a bassa reattività per la MPRL.

Scopo. Per valutare la specificità dei due metodi Roche verso la MPRL, sono stati studiati:

40 sieri normoprolattinemicici (gruppo A)

20 sieri iperprolattinemicici in cui la precipitazione con PEG aveva escluso la presenza di MPRL (gruppo B)

40 sieri iperprolattinemicici in cui la precipitazione con PEG aveva evidenziato la presenza di MPRL (gruppo C)

Risultati. E' stata riscontrata una perfetta correlazione tra i valori ottenuti con i due metodi nei campioni normali e iperprolattinemicici con assenza di MPRL (gruppi A e B). I valori di PRL dei soggetti del gruppo C erano rispettivamente di 100+-56 ng/ml col primo metodo e 31+-12.6 ng/ml col metodo Prolactin II. Dopo precipitazione con PEG, i livelli di PRL monomerica ottenuta nei sieri del gruppo C rientravano nel range di normalità e correlavano significativamente con i valori ottenuti con la nuova metodica. (p<0.001)

Conclusioni. I nostri dati confermano la capacità del nuovo test Prolactin II della Roche di escludere la MPRL dall'immunodosaggio ma anche l'efficienza del PEG di precipitare la MPRL sierica. Poiché i dati della letteratura sono tuttora controversi riguardo il significato clinico della MPRL, l'introduzione di un kit che non risente della MPRL potrebbe aver limitato le informazioni diagnostiche del risultato.

222

CREATININEMIA E STIMA DELLA FUNZIONALITA' GLOMERULARE (GFR) IN POPOLAZIONI DELLA BRIANZA

R. Cecere¹, E. La Valle¹, R. Falbo¹, P. Mocarelli¹

¹*Servizio Universitario di Med. di Lab., Osp. di Desio, Milano*

Le linee guida del National Kidney Disease Education Program raccomandano, per la stima del GFR (indice di filtrazione glomerulare), l'utilizzo dell'equazione basata su concentrazione sierica della creatinina, età, sesso e razza, dello studio MDRD. Piccole variazioni della creatinina

(CRE), nell'ambito della normalità, corrispondono a valori alterati di GFR (≤ 60), che indicano perdita del 50% della funzionalità renale.

Nel nostro studio è stata valutata la distribuzione dei valori di GFR e di CRE nella popolazione che affrisce al Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Desio.

Sono stati analizzati i valori di CRE e GFR di 71781 soggetti che hanno eseguito il dosaggio della CRE non più di una volta all'anno tra il 1991 e il 2005. Per l'analisi statistica la popolazione è stata stratificata in base a sesso ed età (classi di età di 5 anni, da 21 a 75). Si è evidenziata una diminuzione del GFR all'aumentare dell'età: mediana da 103 a 79 mL/min/1.73m² nei maschi, da 96 a 73 mL/min/1.73m² nelle femmine. I valori della CRE mostrano piccole variazioni con un trend per età meno significativo: mediana da 0.97 a 1.08 mg/dL per i maschi e da 0.79 a 0.89 mg/dL per le femmine. La percentuale di soggetti con $GFR \leq 60$ mL/min/1.73m² aumenta con l'età: maschi da 0.07% (età 21-25) a 13.23% (età 71-75) e femmine da 0.37% (età 21-25) a 20.42% (età 71-75) ($p < 0.0001$).

E' stata valutata la percentuale di soggetti con valori di CRE normali o border-line (femmine 0.8-1.1 mg/dL; maschi 1.0-1.3 mg/dL) e $GFR \leq 60$. I valori osservati variano nelle femmine da 0.69% (età 36-40) a 28.11% (età 71-75) e nei maschi da 0.10% (età 56-60) a 8.66% (età 71-75) ($p < 0.0001$).

Si osserva una migliore capacità del GFR, rispetto alla CRE, di evidenziare la graduale riduzione della funzionalità renale all'aumentare dell'età.

Tale equazione permette inoltre di amplificare le piccole variazioni di CRE, all'interno del range di riferimento, che possono essere indicative di una riduzione della funzionalità renale. Bisogna però migliorare l'accuratezza delle misurazioni di CRE per ridurre l'incertezza della stima del GFR.

Reference. Myers G.L. et al. Clin Chem 2006; 52(1), 5-18

223

MEASUREMENT OF CALPROTECTIN IN STOOL: A NON-INVASIVE TEST IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

G. Ciarrocchi¹, L. Marinelli¹, A. Menghini¹, M. Tocchini¹, C. Todeschini², A. Benedetti², G. Feliciangeli²

¹*U.O. Lab. analisi, Sez. Sierologia, Osp. Riuniti, Ancona*

²*U.O. Clinica di Gastroenterologia, Università degli studi, Ancona*

Calprotectin is a binding leukocyte-derived protein, accounting for 60% in the cytosol of neutrophil leukocytes; it has stability in faeces, thus rendering suitable the assessment of protein in stool samples. Calprotectin is considered a biomarker of intestinal inflammation and several studies have demonstrated a close correlation among increased levels of protein in stool and an active inflammatory bowel disease (IBD), such as Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), whereas normal or slightly altered values are found in healthy subjects and in patients with functional irritable bowel syndrome (IBS). A total of 130 patients suffering for a lot of intestinal symptoms were submitted to clinical evaluation and to colonoscopic examination ("gold standard"); they were diagnosed as follows: 51 with CD, 21 with UC, 21 with intestinal pathology other than IBD, 37 with IBS. Assessment of calprotectin was performed in stool samples collected from all enrolled patients and from a group of 30 healthy asymptomatic subjects (ASY). Median calprotectin value was significantly elevated in CD patients (330 mcg/g) and in UC patients (385 mcg/g); normal values were found in IBS patients (40 mcg/g) and in ASY subjects (18 mcg/g), with statistical difference among groups ($p < 0.0001$). Assessment of faecal calprotectin seems to be a suitable, not expensive and non-invasive biomarker of intestinal inflammation causing intestinal mucosal damage, especially in active inflammatory bowel disease. It also provides a useful tool in follow up of diagnosed patients.

224

FALSA SENSIBILIZZAZIONE AL LATTICE DI GOMMA: RUOLO DEI RICOMBINANTIB. Cinti¹, L. Antonicelli¹, L. Finaurini², A. Fusari¹, C. Micucci¹, F. Bonifazi¹, M. Tocchini²¹S.O.D di Allergologia - Ospedali Riuniti - Ancona²Laboratorio Analisi - Ospedali Riuniti - Ancona

Lo studio degli allergeni ricombinanti permette di distinguere all'interno di un allergene le singole proteine capaci di stimolare la produzione delle IgE specifiche. Il dosaggio delle IgE specifiche è per ora disponibile per graminacee, betulacee, parietaria, aspergillo, lattice.

Case report. Un paziente, anni 15, affetto da pollinosi da graminacee, è giunto alla nostra osservazione per un'accentuazione della sintomatologia oculorinica primaverile. L'indagine di screening cutaneo con tecnica prick-test, oltre a confermare la già nota sensibilizzazione alle graminacee, evidenziava una positività al lattice di gomma, pur in presenza di anamnesi negativa. La positività cutanea al lattice veniva confermata dal dosaggio delle IgE specifiche (Rast): UniCAP 250-Phadia: K82 (lattice)= 3,21 U/ml.

Il test in vivo di esposizione con quanto di lattice ha dato esito negativo. Abbiamo allora effettuato il dosaggio delle IgE specifiche per i ricombinanti di graminacee e lattice. Tra i ricombinanti delle graminacee sono risultati positivi: g208-rPhl p1 = 41,2 U/ml, g209-rPhl p6 = 7,8 U/ml e g212-rPhl p12 (profilina) = 13,9 U/ml. Il dosaggio delle IgE specifiche verso i ricombinanti del lattice ha evidenziato la positività esclusivamente della frazione k221-rHet b8 (profilina)= 34,5 U/ml. Sia rPhl p12 che rHet 8 sono profiline. La profilina è un allergene estesamente presente nel regno vegetale, capace di stimolare IgE specifiche; è proprio la presenza di queste IgE specifiche alla base della frequente cross-reattività tra famiglie di vegetali o tra vegetali-alimenti (es. betulla - mela). Qui è causa della "falsa sensibilizzazione al lattice".

Conclusioni. Pazienti che hanno positività verso pollini, possono produrre IgE specifiche verso le profiline. Si possono così verificare positività sierologiche verso altri allergeni, in questo caso il lattice, senza che queste abbiano significato clinico. In generale, lo studio e il dosaggio delle IgE specifiche per i ricombinanti, si propone come prospettiva sempre più avanzata di indagine clinica nelle patologie allergiche.

Bibliografia. Ganglberger E., Het b8, the *Havea brasiliensis* latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant foods and pollen. *Int Arch allergy Immunol.* 2001;125:216-27.

225

EFFECTS OF A DIET WITH INULIN-ENRICHED PASTA ON THE OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS IN YOUNG HEALTHY MALE VOLUNTEERSC. Clemente¹, B. D'Attoma¹, G. Riezzo², M. Chiloiro², V. Bonfiglio², A. Orlando¹, F. Russo¹¹Lab. of Biochemistry, IRCCS "S. De Bellis" Castellana G. (BA)²Lab. of Pathophysiology, IRCCS "S. De Bellis" Castellana G. (BA)

Inulin is a fructoligosaccharide defined as prebiotic. A prebiotic is a food ingredient that must neither be hydrolyzed, nor absorbed in the gastrointestinal tract, be fermented by limited number of beneficial bacteria, and alter the composition of the colon microbiota towards a healthier status (1). Little is known about the influence of prebiotics on the antioxidant status of subjects that assume these substances with the diet. Aim of our study was to evaluate the levels of Malondialdehyde (MDA), CuZn (CuZnSOD) and Mn superoxide dismutase (MnSOD) activities in volunteers assuming a diet with inulin-enriched pasta.

Methods. 10 young healthy male volunteers (19.4±0.5 yrs, M±SD) entered in a double blind cross-over study consisting of a baseline (2 wks) and 5-weeks study period (11% inulin-enriched pasta or control pasta diet) and a wash-out period (8 wks). Fasting serum samples were obtained at the end of each treatment. CuZnSOD and MnSOD activities were assayed by the xanthine/xanthine oxidase/nitrobluetetrazolium method. MDA was determined by TBARS assay.

Results. The statistical analysis was assessed by the Friedman repeated measures analysis of variance on ranks. Although without statistical significance, both CuZnSOD and MnSOD decreased after prebiotic treatment, while MDA levels substantially remained unchanged. Conclusions. Our preliminary data indicate that prebiotic inulin added to the current diet for 5-weeks is not sufficient to modify significantly the oxidant/antioxidant status in healthy subjects. Probably the administration of simbiotics (probiotic+prebiotic) could enhance these effects.

Reference. *J Nutr* (1999), 129:1398S-1401S.

	Basal	Control Diet	Inulin Diet
MDA $\mu\text{mol/L}$	21.95 (15.22-26.35)	22.67 (15.89-26.14)	23.49 (18.96-27.53)
CuZnSOD U/mL	0.523 (0.256-1.128)	0.635 (0.30-0.791)	0.414 (0.228-0.715)
MnSOD U/mL	0.147 (0.085-0.268)	0.145 (0.017-0.228)	0.112 (0.064-0.219)

Data are expressed as median and 25-75 percentiles.

226

GLI ALLERGENI DEL CONIGLIO DOMESTICO COSTITUISCONO UN FATTORE DI RISCHIO DI SENSIBILIZZAZIONE ALLERGICA ANCHE IN SOGGETTI NON ESPOSTI PER MOTIVI PROFESSIONALI

B. Dente¹, M. Cilento¹, G. D'Amato², G. Liccardi², G. Pepe¹

¹U.O.C. di Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Paolo - ASL 1 Napoli

²Divisione di Pneumologia ed Allergologia, A.O.R.N. Cardarelli, Napoli

Sebbene i conigli domestici siano divenuti molto comuni come animali da compagnia, sono estremamente scarsi i dati della letteratura sulle caratteristiche della sensibilizzazione allergica in soggetti che non abbiano una esposizione professionale.

Lo scopo dello studio è stato quello di determinare le peculiarità della sensibilizzazione allergica, il ruolo dell'esposizione diretta o indiretta a questi animali ed ai loro allergeni in soggetti non a contatto professionale.

Da una popolazione di 1124 pazienti esaminati consecutivamente, abbiamo selezionato tutti i soggetti con cutipositività all'epitelio di coniglio di cui sono state registrate la storia clinica, le modalità di esposizione al coniglio, i risultati dei test cutanei (SPTs) e della valutazione delle IgE totali/specifiche circolanti (CAP System FEIA – Phadia - Sweden Diagnostics). E' stata infine calcolata la prevalenza del possesso di tali animali nella nostra area geografica.

Da un gruppo di 753 pazienti con SPTs positivi per almeno un allergene, 20 (2.65%) risultavano sensibilizzati al coniglio (5 erano monosensibili). Quindici soggetti riferivano contatti diretti con l'animale (7 per possesso e 8 per contatti occasionali fuori casa); 3 pazienti avevano contatto indiretto con possessori di coniglio ed infine 2 individui negavano qualunque apparente esposizione. I pazienti monosensibili (con coniglio in casa) presentavano sintomi respiratori persistenti di grado moderato-severo. La prevalenza del possesso di coniglio nell' area di Napoli è dell'1.56%.

Conclusione. In individui suscettibili senza esposizione professionale, il contatto diretto con il coniglio e, in alcuni casi, anche l'esposizione indiretta o apparentemente il non contatto, possono determinare sensibilizzazione allergica. E' verosimile un incremento di questa sensibilizzazione (anche per esposizione indiretta come avviene per cani/gatti) nel futuro come conseguenza dello aumento della abitudine a tenere il coniglio come animale da compagnia.

Bibliografia. European Committee for Clinical Laboratory Standards: Guidelines for the evaluation of analyzers in clinical chemistry, 3rd. Draft. Berlin: Beuth Verlag GmbH, ECCLS document. Vol 3, n. 2, 1986.

227

SANGUE OCCULTO NELLE FECI: UN TEST DI SCREENING PER CARCINOMA COLORETTALE NELL'ASL DI BRESCIA

E. Grassi¹, S. Fabrizio¹, C. Scotti², A. Indelicato³

¹Lab. Sanità Pubblica ASL Brescia

²Dip. Prevenzione ASL Brescia

³Dir. Sanitaria ASL Brescia

Scopi/Obbiettivi. La DGR 18346/04 Piano Oncologico Regionale definisce tra le azioni prioritarie 2004-2006 in tema di prevenzione secondaria l'avvio dei programmi organizzati di screening per CCR in tutte le ASL. Anche la ASL di Brescia si è attivata per realizzare tale programma. Metodologia. La popolazione target è costituita da soggetti di età compresa fra 50-69 anni. Il Kit per la raccolta del campione é ritirato e poi riconsegnato in farmacia, con le istruzioni sulle modalità di prelievo e il consenso informato. Il campione è poi inviato al Laboratorio di Sanità Pubblica della ASL di Brescia. L'accettazione e l'identificazione del campione avviene tramite un software gestionale che riconosce ed accoppia il codice a barre presente sul campione al codice sanitario dell'utente gestito dal CED aziendale. Il test utilizzato è un test immunoturbidimetrico al lattice per la determinazione quantitativa dell'emoglobina umana nelle feci completamente automatizzato sullo strumento Architect 8000. I soggetti con test positivo sono invitati ad eseguire gli approfondimenti diagnostici presso i centri di secondo livello.

Risultati. Dal 1/12/2005 al 30/04/06 sono stati eseguiti 3561 campioni con una adesione al programma di screening del 31.57%. I campioni negativi sono 3350(94.07%), i positivi sono 211(5.93%). Sono state eseguite 109 colonscopie con le seguenti diagnosi: 39(35.8%) negativa, 56(51.3%) adenoma, 9(8.2%) adenocarcinoma su adenoma, 5(4.6%) adenocarcinoma. Conclusioni. Il CCR è un problema di sanità pubblica in quanto i tassi di incidenza annui standardizzati per fascia di età a Brescia risultano essere pari a 55,6 e 44,5/100000 rispettivamente nei maschi e nelle femmine. Il tasso di mortalità è di 31,6 e 26,4/100000 rispettivamente nei maschi e nelle femmine. L'utilizzo di questo test non invasivo, sensibile, accurato, riproducibile, completamente automatizzato ed economico, inserito in un programma di screening a pieno regime porterebbe benefici considerevoli sia in termini di salute che economici. Infatti la diagnosi precoce delle lesioni precancerose, trattate tempestivamente, interrompono la sequenza adenoma-carcinoma diminuendone la mortalità e la spesa per la cura della malattia in stadio avanzato.

Bibliografia. Registro Tumori ASL Bs

228

BONE METABOLISM AND OXIDATIVE STRESS IN POST-MENOPAUSAL WOMEN

E. Guglielmini¹, D. Butera¹, G. Bivona¹, L. Carubia¹, C. Letizia¹, G. Di Salvo¹, S. Miccichè³, A. Bono², M. Ciaccio¹

¹Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

²Chair of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

³U.O. Clinical Pathology, P.O. Casa del Sole, AUSL n. 6, Palermo

Introduction. Osteoporosis is associated with many etiological causes such as nutrition, cytokines, hormones, and aging. Recently, Reactive Oxygen Species (ROS) are considered to be responsible for the aging process and osteoporosis. In particular, osteoporosis is one of the critical age-related disorders for postmenopausal women, in which bone metabolism is altered because of an accelerated resorption rate. There is evidence that ROS are involved in bone resorption, with a direct contribution of osteoclast-generated superoxide to bone degradation. In addition, it has been demonstrated that osteoblasts produce antioxidants such as glutathione peroxidase to protect against ROS (1). The purpose of our study was to assess whether plasma antioxidant defences are decreased in elderly osteoporotic women compared with controls groups.

Material and Methods. Uric acid, vitamins C,E and A plasma levels were measured in 50 subjects with osteoporosis (45-70 age) and 50 age-matched controls. All antioxidants were detected by HPLC: vitamin C and acid uric were measured by electrochemical detection while vitamin A and vitamin E were measured by UV detection at 280 nm.

Results. Mean plasma levels of vitamin C, vitamin E, Vitamin A, and uric acid were consistently lower in osteoporosis than in controls.

Conclusion. Elderly osteoporotic women had significantly lower levels of all natural antioxidants compared with control. This findings confirm what previous studies suggested that elderly osteoporotic women have lower antioxidant defenses also because antioxidant deficiency has a negative impact on bone mass. The mechanism underlying antioxidant depletion and its relevance to the pathogenesis of osteoporosis deserve further investigation.

References. Basu S. et al. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288:275-279.

229

VITAMIN E AND VITAMIN K1 IN CARDIOVASCULAR DISEASE

E. Guglielmini¹, D. Butera¹, G. Bivona¹, L. Carubia¹, G. Di Salvo¹, C. Letizia¹, S. Miccichè³, A. Bono², M. Ciaccio¹

¹Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

²Chair of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

³U.O. Clinical Pathology, P.O. Casa del Sole, A.U.S.L. n. 6, Palermo

Introduction. The prime role of cholesterol in the pathogenesis of atherosclerosis is almost universally accepted. Lipid peroxidation and LDL modification represent an important step in the formation of atherosclerotic plaques. Vitamin E, with its antioxidant activity, is able to prevent lipid peroxidation. Also calcification occurs early in the development of atherosclerotic plaques and a group of vitamin K-dependent proteins have been identified in calcified atherosclerotic plaques, such as vitamin K dependent- γ -carboxyglutamic acid (Gla)-proteins. The only known function of these proteins is to bind calcium and it has been suggested that Gla-proteins may be actively related to atherosclerotic calcification (1). We studied the association of the concentrations of cholesterol, vitamin E and vitamin K1 in the sera of normocholesterolemic and hypercholesterolemic subjects.

Material and Methods. Serum levels of vitamin E, vitamin K1 and cholesterol were measured in 20 subjects adults normocholesterolemic (age: 31-72 years; ♂ 10 and ♀ 10) and 20 subjects hypercholesterolemic (age: 34-63 years; ♂ 10 and ♀ 10). Serum cholesterol was measured by enzymatic methods whereas vitamin E and vitamin K1 concentrations were assayed by established simultaneous liquid chromatography procedures.

Results. The mean concentration (\pm SD) of vitamin E (V.N 5-20 mg/L) in the normocholesterolemic subjects was $7,0 \pm 1,5$ mg/L, in the the subjects hypercholesterolemic was $12,0 \pm 2$ mg/L. The mean concentration (\pm SD) of vitamin K1 in the normocholesterolemic subjects was 340 ± 50 μ g/L, in the hypercholesterolemic subjects was 570 ± 80 μ g/L.

Conclusion. The current observations highlight a good linear correlation between vitamin E and K1 and plasma cholesterol concentrations. From a biochemical point of view vitamin E and vitamin K1 may be regarded as being antiatherogenic. From a clinical point of view, the reduction of serum cholesterol coexists with a concomitant reduction of vitamin E and vitamin K1 plasma levels. These findings deserve to further investigation.

References. Yasui T. et al., (2006) *Menopause* 13:314-322.

230

EARLY PRENATAL DIAGNOSIS OF A PARTIAL TRISOMY 18q PERFORMED BY QUANTITATIVE FLUORESCENCE POLYMERASE CHAIN REACTION (QF-PCR)

A. Lama¹, M. Maniscalco¹, A. Marino¹, A. Porkhun¹, A. Allegra¹

¹Andros Day Surgery, Palermo

Introduction. Prenatal diagnosis of chromosomal anomalies is usually performed by cytogenetic analysis. QF-PCR is a new and fast diagnostic tool for prenatal detection of major autosomal and sexual aneuploidies, such as trisomies 13, 18 and 21 for autosomes and Klinefelter Syndrome for sexual chromosomes. QF-PCR allows us to characterize these pathologies in a very short period of time (24-48 hours), compared to 15 days of classic cytogenetic analysis. In this case report, we present a very rare condition detected by QF-PCR and confirmed by karyotype: a partial trisomy of the long arm of chromosome 18 (18q), resulting from an unbalanced translocation of chromosomes 13 and 18.

Methods. The amniotic fluid sample belonging to a 31 year old patient was referred to the Cytogenetic and Molecular Biology Unit of ANDROS Day Surgery for cytogenetic analysis. The genetic study was carried out because a tri-test performed elsewhere showed an increased risk of trisomy 18. The same sample was also tested by QF-PCR, which was performed by the amplification of polymorphic Short Tandem Repeat (STR) markers, specific for 13, 18, 21 and sexual chromosomes. Analysis of the PCR products was carried out by capillary electrophoresis.

Results. QF-PCR allowed us to identify a case of partial trisomy of the long arm of chromosome 18 (18q), within 12 hours of receiving the sample. The STR markers (D 18S386, D 18S535 and D 18S51), located on the long arm of chromosome 18, showed a trisomic pattern, while the STR marker D 18S539, located on the short arm of the same chromosome, showed a normal amplification pattern. 15 days later, the diagnosis was confirmed by classic cytogenetic analysis. Karyotype showed two normal chromosomes 18, one normal chromosome 13 and one derivative chromosome 13, formed by one chromosome 13 and the long arm of chromosome 18.

Conclusions. QF-PCR is a sensitive and rapid procedure of aneuploidies involving 13, 18, 21, X and Y chromosomes which represent almost all chromosomal abnormalities. This case report shows that QF-PCR is also able to detect partial aneuploidies as well as complete ones.

Reference. Cirigliano V. et al., *Mol Hum Reprod.* 2004 Nov;10(11):839-46.

231

RELIABILITY OF QUANTITATIVE FLUORESCENCE POLYMERASE CHAIN REACTION (QF-PCR) IN PATIENTS WITH POSITIVE FIRST TRIMESTER SCREENING FOR ANEUPLOIDIES

A. Lama¹, P. Curcio¹, D. Giambelluca¹, A. Volpes¹, A. Allegra¹

¹Andros Day Surgery, Palermo

Introduction. First trimester combined screening is the most accurate and non invasive pregnancy evaluation of risk for trisomies 21, 13 and 18. It achieves a detection rate of 90% for a 5% false positive rate. A screen-negative result reduces maternal anxiety at an earlier stage and screen positive result gives the option of further investigations (Chorionic Villus Sampling-CVS or amniocentesis). Traditionally, cytogenetic analysis is carried out by CVS or amniotic fluid and the results are available in 15 days. Recently, QF-PCR provides diagnosis of the 21, 18, 13, X and Y aneuploidies within 24-48 hours. We underline the correlation, in terms of reliability, between QF-PCR and cytogenetic analysis.

Methods. We selected 82 samples (54 amniotic fluids and 28 CVS) coming from first trimester screening positive women, out of 686 samples referred to Cytogenetic and Molecular Biology Unit of Andros Day Surgery for cytogenetic analysis and QF-PCR. The patients underwent first trimester screening by combination of nuchal translucency measurement and biochemical testing, according to the Fetal Medicine Foundation protocol. QF-PCR was performed by amplification of Short Tandem Repeat (STR) of 21, 13, 18, X and Y chromosomes and capillary electrophoresis. **Results.** QF-PCR results were obtained within 24-48 hours for all but one sample (98.8%). In one case the result was available after 72 hours due to maternal blood contamination. QF-PCR showed chromosome abnormalities in 5 (three trisomies 21, one trisomy 13 and one 18) out of 82 samples (6%) and therefore 77 patients (94%) could be reassured and maternal anxiety drastically reduced within 24-48 hours. All data obtained by QF-PCR were confirmed by full karyotyping analysis except one case due to culture failure. No other chromosome abnormalities were detected.

Conclusions. QF-PCR has been proved to be rapid and reliable in detecting 21, 13, 18, X and Y aneuploidies, which are 95% of all chromosome anomalies. It is able to reduce anxiety of patients with false positive screening within 24-48 hours and anticipates the genetic counselling in the case of an abnormal result. Moreover, it is the only diagnostic step in case of culture failure.

Reference. Cirigliano V. et al. *Mol Hum Reprod.* 2004 Nov;10(11):839-46.

232

LA CISTATINA C: MARCATORE PRECOCE DI INSUFFICIENZA RENALE NEI BAMBINI

A. Maglione¹, R. Catapano¹, G. Di Pascale¹, B. Pennucci¹, L. Picone¹, S. Murolo¹, M. Palladino², A. De Rosa¹

¹S.C. Lab. di Patologia Clinica, Osp. Santobono, Napoli

²Lab. Centro Screening, Osp. SS Annunziata, Napoli

Il dosaggio ematico della Cistatina C (CysC) è un valido indice della velocità di filtrazione glomerulare (GFR). Tale molecola, infatti, per il suo basso peso molecolare è completamente filtrata dal glomerulo e quasi totalmente riassorbita e catabolizzata dal tubulo contorto prossimale. Inoltre, in campo pediatrico il suo dosaggio viene preferito alla valutazione della Clearance della Creatinina (Ccr) perché non è influenzato da sesso, età, dieta e massa muscolare, non richiede raccolta di urine, né "normalizzazione" dei dati. In letteratura è assegnata a questo marcatore anche un'elevata precocità.

Obiettivo. Il nostro scopo è stato quello di valutare se, anche in soggetti di età pediatrica, il dosaggio ematico della CysC fornisca indicazioni cliniche più precoci di quelle ottenute dalla Ccr.

Materiali e Metodi. Lo studio è stato condotto su 51 bambini uro-displasi (36 maschi e 15 femmine) che sono stati seguiti almeno semestralmente per 3 anni. Ad ogni controllo sono stati determinati: la superficie corporea (misurando peso e altezza), la Ccr ed i livelli sierici di CysC. I valori trovati al tempo 0 hanno permesso di dividere i soggetti in 2 gruppi:

- gruppo 1 (Ccr e CysC nella norma)
- gruppo 2 (Ccr nella norma e CysC lievemente alterata).

Il dosaggio della Creatinina è stato eseguito su un analizzatore Olympus AU 640 con il metodo colorimetrico cinetico di Jaffè mentre per quello della CysC si è utilizzato uno strumento BN II – Dade Behring ed un metodo immuno-nefelometrico.

Risultati. Durante i 3 anni di osservazione si è verificato che

- nel gruppo 1 i valori della Ccr sono rimasti nella norma, mentre quelli della CysC si sono lievemente alterati;
- nel gruppo 2 i valori della Ccr sono diventati "patologici" e quelli della CysC si sono ancora più elevati rispetto al tempo 0.

Conclusioni. La CysC risulta possedere anche in campo pediatrico una precocità nell'evidenziare una alterazione della GFR che altri analiti non posseggono.

Bibliografia. Mussap M, Plebani M Crit Rev Clin Lab Sci. 2004;41(5-6):467-550.

233

USE OF CALCIUM ANTAGONIST IS ASSOCIATED WITH REDUCED LEVELS OF PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN-A AMONG HYPERTENSIVE OLDER ADULTS: RESULT FROM IISIRENTE STUDY

A. Minucci¹, G. Onder², P. Lulli¹, A. Russo², R. Bernabei², B. Giardina¹, F. Landi², C. Zuppi¹, E. Capoluongo¹

¹Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University of Sacred Heart, Roma

²Department of Geriatrics, Catholic University of the Sacred Heart, Rome

Background. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), a zinc binding matrix metalloproteinase (MMP), was shown to increase in acute coronary syndromes. Calcium antagonists (CA) can influence the production of several MMP, but no study, so far, has assessed the association between use of CA and PAPP-A levels. The aim of the present cross sectional study was to evaluate if, among older hypertensive adults, PAPP-A levels differ according to use of CA.

Methods. Data are from the baseline evaluation of the IISIRENTE study, which enrolled 364 subjects aged 80 or older. For the present study we selected 314 participants with hypertension. Analyses of covariance were performed to evaluate the differences in PAPP-A levels according to use of CA.

Results. Mean age of participants was 85.6 years (Standard Deviation 4.8), 206 (66%) were women; 58 participants (19%) were using a CA. After adjusting for potential confounders, concentration of PAPP-A was significantly lower among CA users compared with non users (1.57 mIU/L, 95% CI 1.37-1.80 vs. 1.86 mIU/L, 95% CI 1.75-1.98, p=0.03). Among CA, amlodipine was associated with the lowest concentration of PAPP-A (1.44 mIU/L, 95% CI 1.13-1.84, p=0.05). Concentration of PAPP-A was higher among users of CA compared with users of other antihypertensive drugs (1.91 mIU/L, 95% CI 1.75-2.08, p=0.02).

Conclusions. Use of CA, and in particular amlodipine, is associated with reduced levels of PAPP-A. These findings need to be confirmed in prospective studies.

234

EVALUATION OF CARDIAC LABORATORY MARKERS IN PHYSIOLOGIC AND PATHOLOGIC PREGNANCY

M. Montagnana¹, G. Lippi¹, A. Albiero², S. Scevarolli², G. L. Salvagno¹, M. Franchi², G. C. Guidi¹

¹Sez. di Chimica e Microscopia Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Osp. Policlinico, Verona, Italia

²Unità di Ostetricia, Dip. Materno ed Infantile, Osp. Policlinico, Verona, Italia

Aim. N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP) in mild and severe preeclampsia, compared with normotensive pregnancy and non-pregnant women.

Methods. 7 mild preeclamptic women (proteinuria >300 mg/24 h, two readings of systolic blood pressure >140 mm Hg and diastolic blood pressure >90 mm Hg) and 7 severe preeclamptic women (proteinuria >300 mg/24 h, two readings of systolic blood pressure >160 mm Hg and diastolic blood pressure >110 mm Hg) were compared with 37 normotensive pregnant women in different gestational age (10 in first, 10 in second and 17 in third trimester) and 21 non-pregnant women. NT-proBNP and cardiac troponin T (cTnT) were assayed on the Elecsys 2010 analyzer (Roche Diagnostics), along with creatinine (Modular P, Roche Diagnostics) and high sensibility C reactive protein (Hs-CRP; BN II, Dade Behring GmbH).

Results. Results are shown in table 1. No significant difference was observed in NT-proBNP among gestational ages, nor between physiologic pregnancies and controls. A significant difference was observed between mild and severe preeclampsia (50 vs. 229 pg/ml, p=0.001). cTnT, creatinine and Hs-CRP values were within the reference ranges. NT-proBNP correlated positively with mean (r=0.28, p=0.03) and systolic blood pressure (r=0.36, p=0.008). In ROC curve analysis, NT-proBNP allowed to discriminate severe from mild preeclampsia (W=0.980, p<0.0001), displaying 100% sensitivity and 86% specificity at a cut-off value of 96 pg/ml.

Conclusions. NT-proBNP value is significantly higher in severe preeclampsia, reflecting left ventricular stress associated with the disease pathophysiology.

	NT-proBNP (pg/ml)	CRP (mg/l)	Creatinine (mg/dl)
Controls	53.2 (27-74)	0.90 (0.3-1.2)	0.70 (0.63-0.77)
1st trimester	90.9 (42-130)	0.65 (0.2-0.9)	0.56 (0.50-0.66)
2nd trimester	54.1 (37-75)	2.15 (0.7-5.7)	0.58 (0.54-0.61)
3rd trimester	46.25 (16-95)	3.40 (1.6-4.5)	0.53 (0.49-0.61)
Mild preeclampsia	50.4 (32-77)	3.00 (2.4-5.1)	0.58 (0.53-0.62)
Severe preeclampsia	228.7 (202-1116)	4.70 (1.1-5.9)	0.69 (0.61-0.75)

235

ISCHEMIA MODIFIED ALBUMIN AS A MARKER OF PHYSIOLOGICAL HYPOXIA DURING PLACENTATION.

M. Montagnana¹, G. Lippi¹, A. Albiero², S. Scevarolli², G. L. Salvagno¹, M. Franchi², G. C. Guidi¹

¹Sez. di Chimica e Microscopia Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Osp. Policlinico, Verona, Italia

²Unità di Ostetricia, Dip. Materno ed Infantile, Osp. Policlinico, Verona, Italia

Background. The decreased albumin affinity for transition metals, as occurs during ischemia, generates a modified form of the protein, called ischemia modified albumin (IMA), and increases the concentration of biological active free cobalt in blood, which may finally exert a beneficial effect, limiting the extent of ischemic injury by modulation of the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) pathway (1).

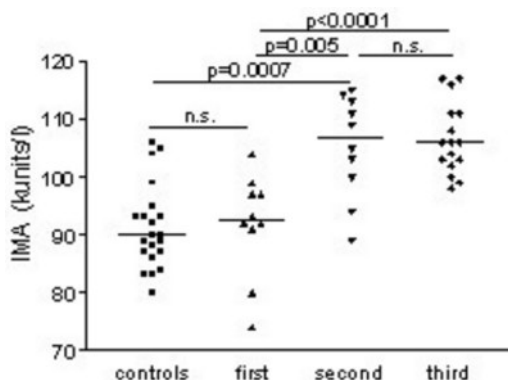
Aim. To evaluate IMA generation within gestational ages as a marker of physiological hypoxia during placentation.

Methods. 37 normotensive pregnant women in different gestational ages (10 in first, 10 in second and 17 in third trimester of pregnancy) and 21 non-pregnant women were investigated. Serum IMA was determined by a colorimetric assay on the Modular System P (Roche Diagnostics GmbH).

Results. A significant difference was observed between first and second trimesters (92.5 vs. 107 kunits/l, p=0.005), but not between controls and pregnant women in the first trimester (89.5 vs. 92.5, p=n.s.) (Fig. 1).

Conclusions. The initial physiological degree of hypoxia occurring after 12 gestational weeks increases IMA generation and enhances free cobalt in plasma, switching on the HIF-1 pathway. This phenomenon may be a key factor in the hypoxia-dependent modulation of HIF-1. In vivo IMA generation may thus be interpreted as an efficient endogenous mechanism of response to ischemia.

Reference. Lippi G, Montagnana M, Guidi GC. Albumin cobalt binding and ischemia modified albumin generation: an endogenous response to ischemia? Int J Cardiol 2006;108:410-1.



236

UTILITA' DEI MARCATORI BIOCHIMICI DI RIMODELLAMENTO OSSEO IN PAZIENTI CON MORBO CELIACO

F. Pagani¹, G. Bonetti¹, F. Lanzarotto², M. Panteghini³

¹Lab. *Analisi Chimico Cliniche, A.O. Spedali Civili, Brescia*

²*U.D. di Gastroenterologia, A.O. Spedali Civili, Brescia*

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

Nei pazienti con morbo celiaco in età adulta si presenta con elevata frequenza un'alterazione del rimodellamento del tessuto osseo. In questo studio abbiamo valutato in un gruppo di tali pazienti i più importanti marcatori biochimici di rimodellamento osseo (MBRO)(fosfatasi alcalina ossea, BALP; osteocalcina, OC; desossipiridinolina urinaria, U-DPD; telopeptide N-terminale del collagene I urinario, U-NTX-I), determinati al momento della diagnosi di celiachia e dopo un anno di dieta priva di glutine. Sono stati inclusi 139 pazienti, 37 maschi (età 20-58 anni) e 102 femmine (età 17-72 anni). Al momento della diagnosi di celiachia, 53 pazienti erano sottoposti a mineralometria ossea computerizzata (MOC) a livello del collo del femore. Il valore di densitometria ossea (BMD)era espresso come T score (numero di DS di cui il BMD del soggetto differisce dal picco di massa ossea di una popolazione di riferimento paragonabile per sesso). In base ai criteri densitometrici dell'OMS, tre pazienti venivano identificati alla MOC come osteoporotici, 26 osteopenici e 24 presentavano normale massa ossea. Tutti i pazienti osteoporotici avevano valori dei MBRO superiori al limite superiore di riferimento (LSR); nei pazienti osteopenici e senza alterazioni ossee alla MOC si evidenziavano valori elevati di BALP nel 27% e 33%, di OC nel 69% e 71%, di U-DPD nel 72% e 58%, di U-NTX-I nel 50% e 30% dei casi, rispettivamente. Nel gruppo di pazienti sottoposti a dieta priva di glutine per un anno (n=126) si evidenziavano significative (p<0.001) riduzioni delle concentrazioni di tutti i MBRO misurati rispetto ai valori basali. 43 (34%) pazienti dimostravano, dopo un anno di dieta, valori dei MBRO ancora >LSR. I risultati di questo studio indicano che la determinazione dei MBRO al momento della diagnosi di celiachia può aiutare a diagnosticare la presenza di un aumentato riassorbimento osseo anche in pazienti con MOC negativa. La significativa riduzione delle concentrazioni di MBRO dopo un anno di terapia dietetica dimostra l'efficacia della stessa per il controllo della patologia ossea nella maggioranza dei pazienti. La persistenza di valori elevati di MBRO anche dopo un anno di trattamento potrebbe indicare la necessità di un'eventuale terapia farmacologica antiassorbitiva.

237

SALIVARY GLUTATHIONE AND URIC ACID LEVELS IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

S. Persichilli¹, G. Almadori², F. Bussu², A. Minucci¹, B. Zappacosta³

¹*Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica - Università Cattolica del Sacro Cuore Roma*

²*Istituto di Clinica Otorinolaringoiatrica - Università Cattolica del Sacro Cuore Roma*

³*Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche - Università Cattolica del Sacro Cuore Campobasso*

Aim. In this study we evaluate the concentrations of glutathione and uric acid, low molecular weight antioxidants, in saliva of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC, in order to identify differences with normal subjects and to obtain information about biochemical alterations of human saliva during carcinogenesis.

Method. We compared 50 HNSCC patients, divided in 2 subsets basing upon tumour site, with a control group of 77 subjects, without a previous diagnosis of HNSCC, matched for age, sex, alcohol consumption and smoking status.

Results. Patients with oral or pharyngeal cancer have significantly higher salivary levels of glutathione than both controls and patients with laryngeal cancer (p <0.001). No differences were found for uric acid levels.

Conclusions. Salivary glutathione levels might be an index of oxidative stress at the level of the upper airways and in particular of oral cavity and pharynx. Therefore high salivary glutathione may be an epidemiological marker to identify subjects with an increased risk of developing HNSCC, to submit to strict follow up and chemoprevention.

238

SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROMS) E GRUPPI TIOLICI PLASMATICI (SH): QUALE RUOLO DIAGNOSTICO? DETERMINAZIONE IN UN GRUPPO DI PAZIENTI IN CONDIZIONI DI SEPSI GRAVE

S. Persichilli¹, C. Rossi¹, A. Minucci¹, L. Montini², S. Fasanella¹, B. Zappacosta³, P. De Sole¹

¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Istituto di Anestesiologia e Rianimazione, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

³Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

Scopo. L'equilibrio extracellulare dello stato redox è il risultato del rapporto tra l'intensità dei processi ossidativi intra- ed extra-cellulari e la quantità di substrati ridotti disponibili. Dal punto di vista biochimico, la misura dei metaboliti delle specie reattive dell'ossigeno (ROMs) e dei gruppi tiolici liberi (SH) può fornire informazioni potenzialmente utili, anche se aspecifiche, per caratterizzare l'entità di processi morbosi nel corso dei quali si ha una alterazione dello stato redox. In una precedente comunicazione (1) abbiamo riportato le misure di ROMs ed SH plasmatici in pazienti in diverse condizioni cliniche (diabetici, emodializzati, cardiovascolari). Nel presente lavoro riportiamo le misure di ROMs ed SH in un gruppo di pazienti in condizioni di sepsi grave al fine di evidenziare significative variazioni rispetto a condizioni cliniche di minore gravità.

Metodi. I ROMs e i gruppi SH sono stati determinati tramite metodi spettrofotometrici applicati a strumenti automatici (OLYMPUS AU400).

Risultati. La concentrazione dei ROMs (pazienti vs controlli) è rispettivamente 238±80 U.Carr vs 264±67 U.Carr (p n.s.) mentre quella degli SH è 192±55 μmoli/L vs 364±77 μmoli/L (p<0.001); il contenuto di SH rapportato al contenuto proteico è rispettivamente 4.4±1.0 μmoli/g vs 5.6±1.0 μmoli/g (p<0.001). L'analisi della correlazione tra ROMs ed SH mostra una significativa correlazione positiva nei controlli ($r^2 = 0.23$; p<0.001) ma non nei pazienti.

Conclusioni. I risultati ottenuti sembrano permettere le seguenti conclusioni:

- 1) I pazienti analizzati mostrano una marcata riduzione dei gruppi SH sia totale che per unità di proteine;
- 2) il principale fattore della riduzione del contenuto di SH non è lo stress ossidativo ma la concentrazione proteica plasmatica;
- 3) Nei pazienti con valori particolarmente bassi di SH si ha una produzione di ROMs non dipendente dagli SH stessi; solo quest'ultima quota sarebbe funzione dell'intensità dello stress ossidativo;
- 4) Contrariamente alle aspettative, la complessità della relazione tra ROMs ed SH rende problematico l'uso clinico della determinazione da ROMs.

Bibliografia. Biochimica Clinica 2005,29, pag. 248

239

GASTROPANEL: A USEFUL SCREENING TEST IN PEDIATRIC POPULATIONS

S. Schiavon¹, G. Guariso², D. Basso¹, M. Fasolo¹, S. Conte², A. Tasinato¹, F. Navaglia¹, C. Zambon³, P. Fogar³, E. Greco¹, M. Plebani¹

¹Dept. of Laboratory Medicine, Univ. of Padova, Italy

²Dept. of Pediatrics, Univ. of Padova, Italy

³Dept. of Medical and Surgical Sciences, Univ. of Padova, Italy

Aim. Ascertain the role of GastroPanel (GP) in screening children for gastric inflammation. Patients. 195 children (101 F, 94 M; mean age 7 yrs) underwent EGDS for chronic abdominal pain. At endoscopy 105 had no evident lesions, 43 antral erythema, 15 diffuse gastritis, 4 duodenitis, 11 esophagitis, 10 micronodular gastritis, 7 mosaic duodenal mucosa. H. pylori (HP) was histologically diagnosed in 17.6% of cases. In fasting sera pepsinogen A (PGA), pepsinogen C (PGC), gastrin-17 (G17), anti-HP Ab were assayed and analysed by the GastroSoft for Excel (Biohit®, Helsinki, Finland).

Results. 108/195 children had an histologically normal mucosa; 68 had gastric inflammation and 19 had extragastric lesions. PGC and anti-HP were significantly correlated with HP infection (t=4.22, p<0.001 and t=5.28, p<0.001). The GastroSoft provided 5 categories: normal, antral gastritis, antral atrophy, antral+body atrophy, body atrophy. GP sensitivity in identifying children with gastric inflammation was 29.4%, the specificity towards extra-gastric diseases was 68.4% while that towards controls was 95.4% (PPV 83.9%; PNV 70.7%). None of the single parameters discriminated gastric inflammation (under ROC curves areas: 0.60 for PGA, 0.63 for PGC, 0.57 for G-17, 0.72 for anti-HP). 6/7 children with mosaic duodenal mucosa were biochemically classified as Having corpus Htropy. 2 had autoimmune gastritis and 4 celiac disease. Conclusion. GP might be an useful non invasive test for screening gastric inflammation in children. This test seems able to indicate also in children the presence of corpus atrophy which has probably to be histologically searched especially in subjects with celiac disease.

240

HOMOCYSTEINE IN ACUTE MYELOID LEUKAEMIA

D. Scribano¹, L. Cudillo², S. Persichilli¹, A. Minucci¹, S. Fasanella¹, P. Neri¹, B. Zappacosta³

¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Istituto di Ematologia, Università Tor Vergata, Roma

³Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

Aims. Increased levels of total homocysteine, a sulphur containing aminoacid derived from methionine metabolism, were found in patients with acute lymphoblastic and myeloid leukaemia (AML). In this study we measured t-homocysteine levels in AML and its correlation with the different categories according to the French-American British (FAB) system.

Patients and Methods. T-homocysteine was measured in 17 AML patients (5 M5, 4 M2, 4 M1 and 4 M3) at diagnosis and day 7, 14, 21, 28 from the start of induction chemotherapy. None took anti-folate drugs. THcy was determined by HPLC according to the method of Araki and Saki.

Results. The data obtained in this study show a positive correlation between tHcy values and WBC count, the only exception being the M3 patients in which higher tHcy values was associated with a lower WBC count. Furthermore, in all AML patients but the M3 patient, tHcy values reverted to normal levels following chemotherapy.

Conclusion. Although in AML patients the Hcy concentration seem to well correlate with the WBC count, further investigations need for M3 subgroup whose cellular and/or molecular characteristics could explain the different Hcy concentration.

241

EVALUATION OF CLINICAL RESULTS, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY STATUS IN PATIENTS UNDERGOING VIDEOLAPAROSCOPIC VS CONVENTIONAL COLECTOMY.

V. Sedda¹, R. Cazzola³, C. Rebuffat², R. Accinni¹, M. Della Porta², S. Russo-Volpe³, C. Della Noce¹, M. Rovagnati², B. Cestaro³, S. Ippolito⁴, S. Vellini², M. Rondanin³, M. Rosina⁴

¹ Institute of Clinical Physiology, CNR, Ca' Granda Hospital, Milan, Italy

² Department of Surgical Science, University of Milan, Ospedale Maggiore-IRCCS, Milan, Italy

³ Department of Preclinical Sciences "LITA Vialba", University of Milan, Milan, Italy

⁴ Department of Medical Science, University of Milan, Ospedale Maggiore-IRCCS, Milan, Italy

Background. Several studies showed that immune and inflammatory response and oxidative stress correlate positively with more invasive surgery. An increase in ROS production and a reduction in antioxidant activity are induced particularly by laparotomy and intestinal handling.

Aim. This pilot study on 21 patients was designed to compare inflammatory status, cellular homeostasis and oxidative stress in video-laparoscopic (11 patients) and in open surgery colectomy (10 patients).

Methods. On plasma samples collected at baseline (T1), 5 hours (T2), 24 hours (T3) and 6 days (T4) after surgery were measured: Interleukin 6 with an immunometric assay, Protein C Reactive with a clinically validated high sensitivity assay method, both total and reduced Homocysteine, Cysteine, Glutathione and Cysteinilglycine, by HPLC with RP-C18 column and fluorometric detector, plasma reducing power with a commercially available kit: OXI-Adsorbent test, Diacron, Italy, lipoprotein susceptibility to peroxidation, by monitoring the kinetics of copper-stimulated plasma peroxidation with a fluorescent method.

Results. All markers showed normal baseline concentration except for Glutathione and Homocysteine that were above reference interval and plasma reducing power that was below. After surgery inflammatory markers peaked significantly in both groups, particularly Interleukin 6 was significantly higher in the open than in the videolaparoscopic group, Cysteine decreased significantly in both video-laparoscopic and open patients, Glutathione and plasma reducing power dropped only in the open surgery group while Homocysteine increased significantly in both groups. A significant decrease in lag-time was observed in both groups as well as a significant peak in the propagation phase slope in the open surgery vs the video-laparoscopic patients. **Conclusions.** These data provide a comprehensive evaluation of inflammation, cellular homeostasis and oxidative stress which correlated positively with the magnitude of surgical injury, thus underlining the advantages of video-laparoscopic colon resection over open surgery.

Reference. Leung KL, Kwok SPY, Lam SCW, Lee JFY, Yiu R C, Ng SSM, Lai PBS, Lau WY Laparoscopic resection of rectosigmoid carcinoma: prospective randomised trial. *The Lancet* 363 1187-92, 2004

242

STRESS OSSIDATIVO E DEMENZE

I. Squellerio¹, F. Veglia¹, M. Alimento¹, P. Ravagnani¹, J. Campodonico¹, L. Zingaro¹, L. Boccotti², E. Tremoli³, V. Cavalca⁴

¹Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano

²Ist. di Cardiologia, Università degli Studi di Milano, Milano

³Dip. di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano, Milano; Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano

⁴Ist. di Cardiologia, Università degli Studi di Milano, Milano; Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano

Studi recenti hanno evidenziato una maggiore incidenza della malattia di Alzheimer (AD) in soggetti con fattori di rischio cardiovascolari quali: ipercolesterolemia, diabete mellito, aterosclerosi e ipertensione arteriosa (1). AD e demenza vascolare (VD) condividono, oltre a fattori di rischio, anche sintomatologia e fisiopatologia, che ne rendono complessa la diagnosi differenziale. Lo stress ossidativo, causato dal disequilibrio tra fattori ossidanti e difese antiossidanti individuali, è uno dei principali meccanismi patogenetici di entrambe le demenze (2). Obiettivo. Identificazione di markers periferici di stress ossidativo in grado di differenziare patologie vascolari da patologie neurodegenerative.

Metodi. In uno studio trasversale sono stati valutati pazienti portatori di ipertensione (IPT n=100), di coronaropatia stabile (AS n=50), di malattia di Alzheimer (AD n=30) e di demenza vascolare (VD n=50). Quali markers di stress ossidativo, sono stati determinati: 8epi-PGF2 α (8-Isoprostane EIA Kit, Cayman, USA), capacità antiossidante individuale (IAC: Oxyadsorbent Test, Diacron, Italy) e specifici fattori antiossidanti (GSH, α e γ -tocoferolo: HPLC). I dati sono stati analizzati con ANOVA e i confronti tra i gruppi sono stati effettuati con il metodo di Duncan.

Risultati. 8epi-PGF2 α risulta significativamente più alto nelle patologie cognitive (p<.0001), in particolare in VD, e negativamente correlato con α -tocoferolo (r=-0.23, p=.007) e con IAC (r=-0.33, p<.0001). Differenze significative si riscontrano analizzando i livelli di vitamina E (α -tocoferolo p<.0001, rapporto α/γ p<.0001) con una diminuzione nelle patologie cognitive. GSH non presenta differenze tra gruppi.

Conclusioni. Nelle patologie cognitive è presente uno stato di stress ossidativo sostenuto da un aumento di isoprostani e da una diminuzione di α -tocoferolo. VD si differenzia da AD e dalla patologia coronarica per un più basso rapporto α/γ . Ulteriori studi potranno chiarire il ruolo delle due forme di tocoferolo e consentire interventi mirati di supplementazione con antiossidanti in soggetti con fattori di rischio per demenza.

Bibliografia. Skoog I et al., Alzheimer Dis Assoc Disord. 1999 Oct-Dec;13 SupplS106-14. Aslan M et al., Curr Alzheimer Res. 2004 May;1(2):111-9.

243

ESPRESSIONE DEL FATTORE DI CRESCITA INSULINO-SIMILE IGF-1, DELLA GHRELINA E DEL SUO RECETTORE GHS-R, IN BIOPSIE DI CARCINOMA COLON-RETTALE E MUCOSA COLICA INDENNE: CORRELAZIONE CON FATTORI PROGNOSTICI, CLINICI E BIOCHIMICI

D. Vannoni¹, A. Lampis², R. Leoncini¹, S. M. Bonomo², S. Gigliani³, A. Santoro³, A. Chessa⁴, S. Civitelli⁴, A. Bernini⁴, S. Petralia¹, S. G. Cella², E. E. Muller², A. E. Rigamonti²

¹Dip. Medicina di Laboratorio, AOUS, Siena

²Dip. Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Univ. Milano

³Dip. Medicina Interna, Sc. Endocrino-Metabol. e Biochimica, Univ. Siena

⁴Dip. Chirurgia Gen. e Specialistica, AOUS, Siena

Obiettivi. L'asse somatotropo è un importante sistema di regolazione della crescita somatica e sviluppo cellulare. Il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1), effettore biologico dell'ormone somatotropo (GH), è un potente fattore mitogeno. La ghrelina, un peptide prodotto e secreto principalmente a livello gastrico, stimola l'assunzione di cibo e il rilascio di GH, contribuendo all'attivazione dell'asse GH/IGF-1. Svolgerebbe, inoltre, un ruolo nella regolazione della proliferazione cellulare (1). Scopo del presente lavoro è la valutazione dell'espressione genica di ghrelina, del relativo recettore (GHS-R) e IGF-1 in pazienti portatori di carcinoma colon-rettale e lo studio delle possibili correlazioni con parametri clinici (stadiazione TNM-Dukes e grading istologico) e biochimici (CEA e CA19-9).

Metodi. Furono valutati 14 pazienti (M/F = 9/5; età = 69 \pm 4 anni). Durante l'intervento di asportazione della massa tumorale, venivano prelevate biopsie di mucosa tumorale e peritumorale a <5cm e >10cm di distanza (che fungevano da controllo), su cui erano valutati, mediante RT-PCR, i livelli di mRNA di ghrelina, GHS-R e IGF-1. I parametri biochimici erano valutati, nei giorni precedenti l'intervento, con i normali esami di screening.

Risultati. Non si osservavano differenze significative dei livelli medi di mRNA suddividendo i pazienti per stadio, grading, sesso, età e sede del tumore. I livelli di mRNA di ghrelina e GHS-R erano positivamente correlati nel tumore e nelle porzioni coliche peritumorali; quelli di IGF-1 e ghrelina lo erano solamente nel tumore e nell'area più prossimale. La correlazione tra IGF-1 e GHS-R era statisticamente significativa solamente nel tumore. Ghrelina e IGF-1 erano positivamente correlati con le concentrazioni plasmatiche di CA19-9 nell'adenocarcinoma e a <5cm, ma non a >10cm, mentre la correlazione tra GHS-R e lo stesso marcatore era statisticamente significativa solamente a <5cm. Non si osservava alcuna correlazione con i livelli di CEA.

Conclusioni. L'interazione tra ghrelina e IGF-1 riveste un ruolo estremamente importante nel carcinoma colon-rettale.

Bibliografia. Korbonitis M. et al (2004) Frontiers in Neuroendocrinology 25:27-68

244

LOW FETUIN-A PLASMA LEVELS ARE ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF CAROTID PLAQUES IN PATIENTS ON DIALYSIS

L. Vocca¹, C. Bellia¹, G. Bivona¹, C. Scazzone¹, E. Lio¹, G. Mingoia¹, E. Di Natale², M. Li Vecchi², M. Ciaccio¹

¹Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

²Chair of Nephrology, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction. Vascular calcification is common among end-stage renal disease patients and a central characteristic of the atherosclerotic cardiovascular disease observed in dialysis patients (1). Fetuin-A, a circulating calcium-regulatory glycoprotein that inhibits vascular calcification, is associated with inflammation and outcome in dialysis patients. In the present study, we evaluated the association between Fetuin-A and clinical phenotype.

Materials and 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. 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.

Fetuin-A plasma levels were measured in 46 patients (age 43-65 years; ♂ 27 and ♀ 19) with end-stage renal disease.

Results. Fetuin-A plasma levels were significantly lower (mean value 0,3 g/L ± 0,242) in these patients. Fetuin-A was significantly associated with the presence of carotid plaques independently of age, cardiovascular disease, diabetes, gender, and inflammation.

Conclusion. The present study shows that a low fetuin-A level is associated with atherosclerosis (carotid plaques), as well as with increased cardiovascular disease and mortality. This supports the hypothesis that low Fetuin-A may promote a process of accelerated atherosclerosis and vascular calcification.

References. Ketteler M. et al., (2003) *Lancet* 361:827-833.

245

CONFRONTO TRA LA METODICA TRADIZIONALE E LA LETTURA AUTOMATIZZATA DEL LIQUOR IN REGIME DI URGENZA

G. Barbina¹, A. Colatutto¹, A. Mazzilis¹, B. Marcon¹, P. Sala¹

¹Dip. Diagnostica di Laboratorio AOSMM, Udine

Obiettivo. Confronto fra la metodica di lettura classica del liquor (LCS) e la lettura con strumento ematologico automatizzato di ultima generazione.

Metodologia. Dal mese di ottobre 2005 a febbraio 2006 sono stati processati 70 campioni di LCS presso l'Istituto di Analisi Cliniche Elezione dell'Ospedale di Udine. I campioni sono stati aliquotati: una parte è stata analizzata con la metodica tradizionale al Microscopio e l'altra aliquota è stata processata con lo strumento Dasit Sysmex XE-2100 entro 30 minuti dal prelievo. L'XE-2100 è uno strumento ematologico che associa la citofluorimetria per lo studio delle popolazioni cellulari ed è in grado di effettuare con affidabilità e precisione le conte su campioni a bassa cellularità come LCS ed altri liquidi biologici.

Risultati. Sono stati testati 70 campioni e dai dati in nostro possesso si può evidenziare una maggiore sensibilità da parte della metodica strumentale, nei confronti di quella manuale: infatti nel 57% vi è stata concordanza tra la valutazione tradizionale e l'esame strumentale mentre nel restante 43% dei casi si è notato una esclusiva capacità discriminante dello strumento XE-2100 di contare correttamente gli elementi cellulari.

Considerazioni conclusive. L'XE-2100 è in grado di effettuare una conta affidabile, sensibile e specifica degli elementi cellulari presenti nel LCS. Queste considerazioni potrebbero essere la premessa per lo studio prospettico volto ad individuare un diagramma di flusso in cui il LCS viene prima analizzato con la metodica strumentale, ed eventualmente con la metodica tradizionale ove vi fossero delle alterazioni morfologiche particolari. La possibilità di analizzare in urgenza con un metodo ripetibile, sensibile e specifico un campione il cui esame ha sempre risentito della variabilità intra-operatore è un indubbio vantaggio sia per alleviare il carico di lavoro al laboratorio sia per una ottimizzazione della risposta ai reparti.

Bibliografia. Marthe W. Aune, et al. Automated flow cytometric analysis of blood cells in Cerebrospinal fluid. *Am J Clin Pathol* 2004;121:690-700.

246

PRELIMINARY EVALUATION OF A NEW COMMERCIAL AUTOMATED METHOD FOR THE DETERMINATION OF MICROALBUMIN IN URINE SAMPLES

S. Brambilla¹, H. Al-Maloukh², M. Longo¹, E. Prini¹, S. Valaperta¹, A. Montanelli¹

¹Lab. Analisi Cliniche, Ist. Clin. Humanitas IRCCS, Rozzano, Milano

²Clin. Lab., Greek Catholic Society, Infant Welfare Center, Jerusalem, Old City

Introduction. Microalbuminuria (MALB) is urine excretion of 20-200 mg/L albumin caused by a disturbance in the glomerular filtration barrier. If caused by physical stress, fever, cardiac failure or hypertension, its levels can return to normal. With damage in the glomerular filter as in insulin-dependent diabetic patients, a constantly detectable MALB is found. The immunologic methods are the most common because able to detect these small amounts of albumin considered as a risk factor for cardiovascular disease.

Materials, Methods, Results. We compared this new immunologic method (Microalbumina-Abbott) with the one currently in use in our laboratory (Albumin-Sentinel) using the instrument Architect Ci8200-Abbott: 90 spot urine samples (albumin from 0.00 to 1147.35 mg/L) have been analysed. We found a good accordance between the two methods ($y=0.9913x+0.9455$; $r=0.9979$).

For the evaluation of the within-run precision we collected 9 samples with the amounts of albumin listed above and performed the analysis 10 times in the same run. For each sample we calculated standard deviation and coefficient of variation (CV%). CV% ranged from 2.7 and 1.3% for <50 mg/L albumin values, <1.3% for 50-450 mg/L albumin values and >1.6% for >450 mg/L albumin values.

We evaluated the between-runs precision performing albumin measure on two different control materials with concentrations of 43 and 156 mg/L (CV% from 6.1 to 3.2%) and on two different biological samples with albumin values of <5 and 136 mg/L (CV% from 12.1 to 9.7%).

The theoretical limit of detection calculated from standard deviation curve is of 1.2 mg/L (producer declared value 5 mg/L).

The method is linear in the whole interval of concentration (5-500 mg/L) and we found recovery values ranging from 98 to 109%.

Conclusions. Analytical performances are fully satisfactory in particular as far as precision values at low concentration levels are concerned.

The wide linearity range allows a cutting down in diluting samples; this peculiar feature, together with ready-to-use reagents, specific calibration materials and its total automation, makes this new method a quite practicable one.

Reference. Redon J. Measurement of microalbuminuria-what the nephrologists should know. *Nephrol Dial Transplant* (2006)21:573-576.

247

CONFRONTO TRA HPLC E METODO ENZIMATICO PER IL DOSAGGIO DELL'OMOCISTEINA PLASMATICA

E. Cavalcanti¹, M. Cilento¹, P. Cortese¹, O. Figoni¹, P. Pinto¹, C. Saggioccolo¹, B. Dente¹

¹U.O.C. di Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Paolo, ASL 1 Napoli

L'omocisteina è un importante fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, pertanto negli ultimi anni si è assistito ad un notevole aumento delle richieste del suo dosaggio. L'HPLC è attualmente il metodo di riferimento, ma recentemente sono stati introdotti metodi enzimatici applicabili ad analizzatori automatici di Chimica Clinica, con il vantaggio di non necessitare di apparecchiature dedicate e conseguente riduzione di costi e tempi di esecuzione. Abbiamo voluto quindi confrontare uno di questi metodi con quello HPLC in uso nel nostro laboratorio.

Materiale e metodi. Il kit Omocisteina Enzimatica Axis-Shield è stato applicato all'Analizzatore Olympus 400 con lettura a 340nm alla Temperatura di 37°C. Il confronto è stato effettuato con il metodo HPLC (Biorad) con rilevazione in fluorescenza. Sono stati confrontati i risultati ottenuti con i due metodi su 70 campioni di plasma anticoagulati con EDTA, da pazienti ricoverati. I campioni, subito dopo l'arrivo, sono stati centrifugati, separati, congelati a -20°C e le determinazioni eseguite contemporaneamente in tre sedute analitiche, dopo verifica delle strumentazioni, delle calibrazioni e dei relativi controlli.

Abbiamo voluto altresì correlare i risultati ottenuti su 40 campioni anticoagulati sia con EDTA che con Na Citrato, raccolti in modo random secondo le procedure sopra descritte.

Risultati. L'analisi della regressione lineare indica che il metodo enzimatico mostra una ottima correlazione con quello HPLC ($y = 1.01x - 0.563$ $r = 0.996$ $p < 0.0001$) nell'intero intervallo dei valori studiati (3.5-60 $\mu\text{mol/L}$). Abbiamo invece riscontrato una differenza nei risultati dei campioni raccolti con le due diverse modalità (EDTA, Na Citrato) non giustificata dal diverso rapporto sangue/anticoagulante. I valori dei campioni con EDTA erano significativamente più elevati di quelli con Na Citrato per un probabile effetto stabilizzante di quest'ultimo.

Conclusioni. Il metodo enzimatico preso in esame, è pertanto idoneo, per le sue caratteristiche, all'utilizzo in Laboratori che non dispongono di strumentazione dedicata.

Bibliografia. Salazar J. F., Herbeth B., Siest G., Leroy P. Stability of blood Homocysteine and Other Thiols. EDTA or Acid Citrate? *Clin. Chem.* 45,11;1999

248

ESATTEZZA DELLA MISURA DELLA CREATININA: RISULTATI DELLA COMPONENTE ITALIANA DI UN ESPERIMENTO EUROPEOF. Ceriotti¹, I. Infusino², P. Luraschi², L. Thienpont³, M. Panteghini²¹Diagnostica e Ricerca San Raffaele SPA, Milano²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, A.O.L. Sacco, e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano³University of Ghent, Belgium

Nel 2003 l'associazione dei nefrologi Americani ha lanciato una campagna (1) in favore del calcolo della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) in base al valore della creatinina sierica mediante l'uso di formule. Il risultato delle formule può essere però fortemente influenzato dal metodo di misura della creatinina. Infatti i valori di creatinina che portano ad una GFR <60 ml/min (livello decisionale per insufficienza renale) si collocano, in base all'età e al sesso, fra 0.95 e 1.50 mg/dL. A queste concentrazioni i metodi oggi in uso presentano grandi problemi di accuratezza e, spesso, anche di imprecisione. Per fare il punto sulla situazione è stato lanciato un progetto che ha coinvolto 6 nazioni europee: Italia, Germania, Belgio, Olanda, Svezia, Francia. Qui presentiamo i dati del ramo italiano. 3 campioni di pool di sieri umani congelati, con valore assegnato mediante metodo di riferimento GC-IDMS, sono stati distribuiti e misurati in quintuplicato con i seguenti sistemi analitici: Abbott: 2 Architect e 2 Aeroset; Bayer: 3 Advia 2400 (enzimatico), 2 Advia 1650 (Jaffè); Beckman: 5 Synchron LX20; Dade Behring: 3 Dimension RxL; Olympus: 3 AU 640, 1 AU 5400, 1 AU 2700; Ortho: 2 Vitros Fusion, 1 Vitro 250, 2 Vitro 950; Roche (enzimatico): 2 Integra 800, 1 Hitachi 912; (Jaffe): 5 Modular.

Sono stati prodotti 585 risultati da 37 laboratori, di seguito riassunti:

Valore atteso (mg/dL) L1 0.8599 L2 1.735 L3 3.461
 Media ottenuta (mg/dL) L1 0.9565 L2 1.819 L3 3.508
 Bias dal valore atteso L1 11.2% L2 4.8% L3 1.4%
 Variabil. nella serie L1 2.49% L2 1.35% L3 1.03%
 Variabil. intra-metodo L1 3.91% L2 2.45% L3 2.03%
 Variabil. tra metodi L1 6.52% L2 2.07% L3 2.59%
 Variabil. complessiva L1 8.00% L2 3.48% L3 3.45%

La precisione nella serie è sempre risultata buona; la fonte maggiore di variabilità sono i diversi sistemi analitici. A basse concentrazioni di creatinina la sovrastima media complessiva era rilevante (+11%) con picchi fino a +20%. Solo i metodi enzimatici davano risultati sufficientemente accurati. Appare quindi indispensabile procedere ad una standardizzazione della misura della creatinina prima di implementare definitivamente la stima della GFR con le formule suggerite.

Bibliografia. Ann Intern Med 2003;139:137

249

VALUTAZIONE DELL'APPLICAZIONE DELLA METODICA MANUALE IMMUNOTURBIDIMETRICA ASO LATEX NEL SIERO E NEL PLASMA UMANI, SUL SISTEMA AUTOMATICO VITROS 5.1/FS (ORTHO)G. Cocchi¹, B. Milanese¹, E. Bernardi¹, E. Galletti¹¹Laboratorio di Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero di Desenzano del Garda, Azienda Ospedaliera di Desenzano, Desenzano del Garda (BS)

Scopo. Valutare le prestazioni analitiche del Vitros 5.1/FS nei dosaggi immunoturbidimetrici, applicando la metodica manuale ASO Latex di Sentinel Diagnostics sfruttando la possibilità offerta dalla strumentazione di implementare metodiche libere.

La valutazione eseguita trova la sua finalità nell'ipotesi di consolidare su un'unica strumentazione sia la biochimica che i dosaggi delle proteine plasmatiche, in modo da trasferire test attualmente effettuati su Nefelometro in altro laboratorio aziendale. Questo consentirebbe di razionalizzare la gestione dei campioni e il TAT complessivo nell'ottica del miglioramento dell'intera routine con minimizzazione della movimentazione di aliquote di sieri, del rischio d'errore, dell'impegno di personale e dei costi di gestione.

Metodi. È stato valutato il test ASO Latex di Sentinel Diagnostics in applicazione sul Vitros 5.1/FS di Ortho Clinical Diagnostics. La correlazione è stata fatta vs. Nefelometro Dade-Behring BNAll.

La valutazione ha comportato le prove di: precisione, accuratezza, linearità, stabilità calibrazione, correlazione. Risultati. Dimostrano un'ottima correlazione con il metodo di riferimento in nefelometria [$r=0.99$, $Y(\text{BNA})=1.04 X(\text{Vitros}) + 4,27$; $n=56$ (range 51-1750 UI/ml)].

Precisione Intra-serie ($n=20$):($X_{\text{medio}}=122$ CV%=2.2 e $X_{\text{medio}}=341$ CV%=1.26). Precisione Inter-serie ($n=2/\text{day}=10$):($X_{\text{medio}}=115$ CV%=2.43 e $X_{\text{medio}}=324$ CV%=2.58). La linearità del metodo è stata accertata per diluizioni fino 1:32 con concentrazione iniziale pari a 326 UI/ml.

Stabilità della calibrazione a 29 e 43 gg.: nessuna variazione significativa.

Questi risultati sono uguali o migliori di quelli dichiarati dal produttore per la metodica in manuale.

Conclusioni. La valutazione eseguita ha dimostrato che il sistema Vitros 5.1/FS, pur essendo un analizzatore dedicato alla grossa routine di laboratorio, risulta di semplice utilizzo e facile apprendimento per quanto riguarda l'implementazione di test aggiuntivi, permettendo la completa personalizzazione dei metodi e garantendo un'ottima correlabilità con gli standard di riferimento. A fronte di questi risultati è possibile ipotizzare un consolidamento dei test eseguiti in nefelometria su questo strumento al fine di ridurre i costi operativi e ottimizzare l'intero processo lavorativo.

250

DOSAGGIO DELLA TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE: CONFRONTO TRA METODIS. Prudente¹, F. Musetti¹, B. Danesi¹, C. Martinelli¹, A. Del Genovese¹¹Laboratorio di Analisi Biochimico- Cliniche e Microbiologiche ASL1 Massa-Carrara

Introduzione. Il dosaggio della transferrina carboidrato carente (CDT) è ampiamente indicato in letteratura come l'indice di laboratorio più affidabile per la valutazione dell'abuso alcolico cronico. Le metodologie impiegate più frequentemente per il dosaggio quantitativo della CDT sono di tipo immunometrico o cromatografico, queste ultime sono utilizzate come metodi di conferma per la comprovata affidabilità dei risultati.

Scopo del lavoro è la valutazione di un metodo per la determinazione della CDT impiegabile su un analizzatore automatico per il dosaggio rapido di un alto numero di campioni.

Materiali e Metodi. Su 80 sieri di persone sottoposte a verifica di idoneità alla guida è stata dosata la CDT utilizzando un nuovo metodo nefelometrico N Latex CDT Dade-Behring® applicato allo strumento BNA II e l'elettroforesi capillare GeneDia® eseguita con lo strumento P/ACE 5000 System Beckman Instruments. Il primo metodo impiega un anticorpo monoclonale che lega le isoforme della transferrina prive di una o due catene sialiche. Il secondo metodo prevede la saturazione con sali di ferro del siero e la successiva separazione delle isoforme mediante migrazione del campione.

Risultati. Il confronto statistico effettuato mediante il calcolo del coefficiente di correlazione, indica un buon accordo generale tra i due metodi $r = 0,90$. La diversa dispersione dei dati raccolti con i due metodi è stata inoltre valutata, sulla base dei risultati dell'elettroforesi capillare, in tre serie di campioni negativi, borderline, positivi. Tale suddivisione evidenzia una forte perdita di correlazione per i campioni negativi ($r = 0,32$) e borderline ($r = -0,05$).

Conclusioni. Il confronto tra i due metodi evidenzia una bassa sensibilità del metodo N Latex rilevabile dalla perdita di correlazione nei campioni borderline e negativi. Considerando la rilevanza della determinazione della CDT in ambito forense si reputa necessario confermare i risultati positivi ottenuti con tecniche immunometriche con altre metodologie più sensibili.

Bibliografia. Bortolotti et al. Clin Chem 2005;51:2368-71

251

TOTAL PLASMATIC HOMOCYSTEINE LEVELS: COMPARATIVE EVALUATION OF THREE DIFFERENT METHODSM. Dessi¹, A. Pastore², V. Luciani¹, G. Di Giovamberardino², G. Federici¹, R. Zenobi¹, O. Porzio¹¹Department of Laboratory Medicine University Hospital "Tor Vergata", Rome, Italy²Biochemistry Laboratory, Children's Hospital and IRCCS "Bambino Gesù", Rome, Italy

Hyperhomocysteinemia (Hcy) is a risk factor for cardiovascular disease. In clinical practice it is important to have an efficient and rapid method to determine the wide variability of the Hcy levels in different pathological states, while the available methods are, generally, complex and/or of low throughput.

The aim of this study was to compare the analytical performances and practicability of two fully automated systems vs. the gold standard HPLC method in Hcy determination.

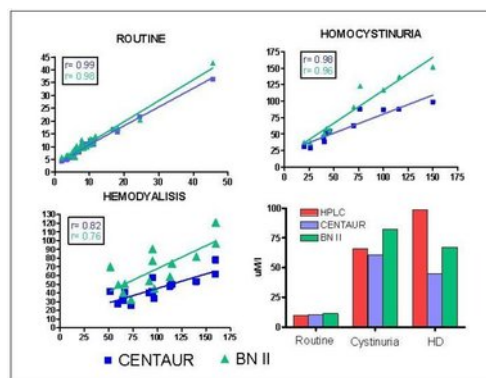
The plasmatic tHcy levels were assayed by 1) HPLC method using reversed-phase separation and fluorescence detection 2) an automated chemiluminescence system (ADVIA Centaur, Bayer) and 3) nephelometric method (BN II Nephelometer, DADE BEHRING).

We have measured 100 samples from clinical practice (42M, 58F), 20 homocystinuric patients (11M and 9F) and 30 hemodialysis patients (HD)(16M, 14F).

Results are resumed in figure 1.

In clinical practice and homocystinuric populations, there is a significant good correlation between HPLC and automated methods, with no differences in mean values. In HD patients, there is less correlation between HPLC and both analytical methods and mean values are significantly lower in Centaur assay. This negative bias is probably due to the characteristics of haemodialysis plasma and so HPLC should be preferred for tHcy determination in HD patients. Our results show that Centaur and BN II have equal analytical performances than HPLC method in routine and hyperhomocystinuric patients: we conclude that these automated systems are useful and practicable alternatives to the current chromatographic methods for tHcy assay.

Reference. Pastore A, et al. Clin Chem 1998;44:825-832.



252

AUTOMAZIONE DELL'ESAME DEL SEDIMENTO URINARIO: CONFRONTO FRA iQ200 E MICROSCOPIA

S. Granata¹, M. C. Straface¹, C. Ballabio¹, R. Salerno¹, C. Sbressa¹, A. Marocchi¹

¹Lab. di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologia, A.O. Niguarda, Milano

Scopo. Valutare la capacità dello strumento iQ200 (Instrumentation Laboratory) di: 1) riconoscere gli elementi patologici presenti nelle urine 2) identificarli in modo corretto.

Materiali e Metodi. Lo strumento si basa sull'analisi di urina nativa con un flusso laminare focalizzato in cella a flusso planare con microscopio automatizzato e digitalizzazione di ogni singolo fotogramma. Ogni elemento viene analizzato per dimensioni, contrasto con il medium, forma e contenuto interno e trasformato in valori numerici processati da una rete neurale che li classifica in 12 categorie: globuli rossi GR, globuli bianchi GB, aggregati di GB, cilindri ialini, cilindri patologici, cristalli, muco, cell. epiteliali squamose, cell. epiteliali non squamose, miceti, batteri, spermatozoi. Sono stati selezionati 300 campioni patologici dopo esame chimico-fisico (Atlas Clinitek, Bayer) e sedimento automatizzato (UF100, Dasit) con i criteri da noi impostati sul sistema gestionale Labfinity (Dasit) e successivamente controllati al microscopio.

Risultati. Abbiamo analizzato la concordanza fra il dato originale dello strumento (senza intervento della revisione dell'operatore e del sistema di gestione Uromante IL) con l'esame microscopico. Globuli Rossi: falsi negativi 27 campioni (11,34%), falsi positivi 20 (8,4%). Globuli Bianchi: falsi negativi 15 (6,3%), falsi positivi 5 (2,1%). Cilindri: falsi positivi zero, falsi negativi 20 campioni. Sono stati valutati le diverse tipologie di cilindri: cilindri ialini, ialino-granulosi, i cristalli e i miceti. Si è determinata la precisione per i GR ed i GB oltre alla valutazione del carry-over.

Conclusioni. Lo strumento ha una enorme potenzialità nella visualizzazione degli elementi che sono facilmente riconoscibili dall'operatore nei diversi fotogrammi, anche nella sottoclasse di elementi non classificati creata dallo strumento stesso; ciò permette una completa automazione e la semplificazione della procedura analitica, riducendo a bassissime percentuali (circa 5% su 300 campioni patologici) i campioni da rivedere al microscopio.

Bibliografia. Lammchiaghase P. et al. Clin.Chim.Acta 2005;44:167-174

253

DOSAGGIO ENZIMATICO DELL'OMOCISTEINA

A. Latte¹, G. Cangiano¹, M. Russo¹, F. Forte¹, E. Di Maina¹, M. D'Amora², A. Risitano¹

¹U.O. Lab. Patologia Clinica, P.O. dei Pellegrini, ASL NA1

²U.O. Lab. Patologia Clinica, P.O. degli Incurabili, ASL NA1

L'omocisteina (HCY) deriva dal metabolismo della metionina. Il suo accumulo ematico può danneggiare le arterie e l'infiammazione derivante può determinare deficit di circolo coronarico.

Elevate concentrazioni sono indicative di rischio di danni alle arterie simili a quelli prodotti da aumentata colesterolemia.

Col presente lavoro si valuta il kit enzimatico della ditta Axis-Shield (UK) adattato sull'analizzatore AU 600 della ditta Olympus.

L'HCY legata o in forma di dimero (forma ossidata) viene ridotta in HCY libera, che reagisce con la serina in una reazione catalizzata dalla cistationina beta-sintetasi per formare L-cistationina. Quest'ultima a sua volta viene scissa da una beta-liasi fino a formare l'omocisteina, il piruvato e l'ammoniaca.

Il piruvato viene quindi convertito dalla lattato deidrogenasi in lattato con la rilevazione del NADH a 340 nm.

La reazione enzimatica (cinetica 1) viene estrapolata tra il 15° ed il 27° ciclo macchina e si utilizzano due calibratori acquosi a concentrazione di 0 e 27 µmol/L.

A 225 µL di reagente I (200 µL di soluzione costituita da 36 parti di R1 e 15 parti di R2; 25 µL di acqua), vengono miscelati 14 µL di campione (plasma ottenuto da sangue con EDTA).

Dopo opportuna incubazione (circa 10 cicli macchina) l'analizzatore inserirà 50 µL di reagente II (25 µL di reagente 3; 25 µL di acqua).

Il reagente I contiene riducente, NADH, LDH, serina e tampone mentre nel reagente II sono contenuti la beta-sintetasi e beta-liasi cistationina.

La stabilità della miscela R1-R2 è massima nelle prime 24 ore e si riduce di circa il 10% in seconda giornata.

Nell'intervallo 3 - 50 µmol/L di HCY si evidenzia un profilo di imprecisione con CV < 5%. Le prove di recupero evidenziano valori tra 92,9 e 111,2% (recupero medio del 99,5%).

La precisione nella e tra le serie, mostra un CV < 4%.

Buona è la correlazione con il metodo HPLC (X)– detector in fluorescenza – della ditta Biorad ($r = 0,9987$; $y = 0,8762.x + 0,8006$).

In uno studio condotto su 98 soggetti adulti (età > 20 anni) in buona salute si riscontrano valori tra 4,1 e 15,6 mmol/L di HCY.

Bibliografia. Brunelli T., Pepe G. et Al. Comparison of three methods for total homocysteine plasma determination. Clin Lab 2001;47:393-397.

254

DOSAGGIO FOTOMETRICO DEI SOLFATI URINARIA. Latte¹, G. Cangiano¹, M. Russo¹, F. Forte¹, E. Di Maina¹, M. Terribile², M. D'Amora³, A. Risitano¹¹U.O. Lab. Pat. Clinica, P.O. dei Pellegrini, ASL NA1²U.O. Nefrologia, P.O. dei Pellegrini, ASL NA1³U.O. Lab. Pat. Clinica, P.O. degli Incurabili, ASL NA1

La determinazione dei solfati rilevata sulle urine delle 24 ore è il parametro laboratoristico maggiormente correlato all'assunzione di proteine animali ed è pertanto utile nella diagnostica e monitoraggio, oltre che nella prevenzione dei pazienti con calcolosi renale.

In sostituzione dell'oneroso e peculiare dosaggio cromatografico, effettuato solamente in centri specialistici, non sembrano avere grande specificità per la determinazione dell'apporto proteico animale, i dosaggi di azoturia, fosfaturia ed ammonio urinario.

Col presente lavoro si valuta pertanto una nuova metodica turbidimetrica da noi costruita e messa a punto sull'analizzatore di chimica clinica AU 600 della ditta Olympus.

Il solfato viene precipitato con una soluzione acida di cloruro di bario: si ottiene solfato di bario rilevato a 600 nm.

La reazione a termine si estrapolata tra i cicli macchina 0 ed 1 e si utilizza una calibrazione (spline 4AB) a 4 punti a titolo di 0 – 37,5 – 150 e 300 mg/dL di solfato di litio. In tali condizioni si ha una linearità fino a 400 mg/dL.

E' possibile calibrare con un solo calibratore di 150 mg/dL (linearità fino a 250 mg/dL). L'instabilità del precipitato impone di effettuare la seduta analitica subito dopo la calibrazione.

A 200 µL di reagente 1 (0,8 mg di cloruro di bario in 100 mL di HCl 0,1 M) sono miscelati 15 µL di urina.

Nell'intervallo 5 – 500 mg/dL di solfati si evidenzia un profilo di imprecisione caratterizzato da un CV < 3%. Le prove di recupero tra 50 e 400 mg/dL evidenziano valori tra 97,2 ed il 102,9% (recupero medio del 99,3%). La precisione nella e tra le serie, mostra un CV < 3,5%.

Ottima è la correlazione ottenuta tra i valori teorici (x) e quelli sperimentali (y) di urine a cui sono state aggiunte aliquote crescenti di standard ($r = 0,999$; $y = 0,9744.x + 7,4774$).

In uno studio semestrale condotto su 107 soggetti adulti si sono riscontrati valori tra 1,23 e 4,64 g/24h di solfato urinario.

Quanto sopra rappresenta una mera sperimentazione scientifica. Per l'applicazione clinica ci si riferirà al D.Lgs. n° 332 dell'8/9/2000.

Bibliografia. Terribile M. et Al. Valutazione metabolica e gestione medica della nefrolitiasi: quale futuro? Giorn. di Tecn. Nefrol. e dialitiche. Ed. Wichtig 2004. XVI;3:140-142.

255

DOSAGGIO DELL' OLOTRANSCOBALAMINA (HOLO-TC): PERFORMANCE ANALITICA DEL NUOVO METODO IMMUNOENZIMATICO (AXIS-SHIELD) SU ANALIZZATORE AXSYM (ABBOTT DIAGNOSTICS)S. Lonati¹, C. Novembrino¹, V. Uva¹, D. Sansaro¹, R. De Giuseppe¹, G. Lunghi², E. Torresani³, G. Lambertenghi Deliliers⁴, F. Bamonti¹¹Dip. Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Osp. Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano²Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Fondazione IRCCS Osp. Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano³Lab. Patologia Clinica, Dip. Area Servizi Diagnostici, Fondazione IRCCS Osp. Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano⁴Dip. Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, U.O. Ematologia 1, Fondazione IRCCS Osp. Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

La vitamina B12 (B12) è essenziale per il metabolismo dei composti monocarboniosi e per la divisione cellulare; la sua carenza, coinvolta nell'insorgenza di anemia megaloblastica e di patologie progressive del sistema nervoso centrale e periferico, richiede una diagnosi precoce per un intervento tempestivo. Attualmente si utilizzano in routine metodi che determinano la concentrazione totale di B12 sierica, mentre la quota di B12 funzionale è solo quella legata alla proteina trasportatrice transcobalamina formando l'olotranscobalamina (Holo-TC); questa caratteristica, insieme alla breve emivita in circolo, fanno di Holo-TC un indice del reale stato funzionale ed un marker precoce della carenza di B12. Finora il dosaggio di Holo-TC è stato effettuato con metodo RIA o ELISA. In qualità di partecipanti al team internazionale di valutazione del test in fase precommerciale, abbiamo valutato la performance analitica del nuovo metodo immunoenzimatico diretto per il dosaggio di Holo-TC (Axis-Shield) su analizzatore automatizzato AxSYM (Abbott Diagnostics). Riproducibilità e ripetibilità sono state determinate sui controlli forniti dal produttore (low:L, high:H) e su un pool di sieri prodotto nel nostro laboratorio (P), analizzati in duplicato in due sedute analitiche al giorno per 5 giorni. Recupero e linearità sono stati valutati su frazioni di un pool di siero ad alta ed uno a bassa concentrazione di Holo-TC miscelati in diverse proporzioni; il limite di rilevabilità è stato calcolato mediante il dosaggio nella stessa serie di 25 replicati del calibratore 0. Lo studio della performance analitica ha fornito i seguenti risultati: riproducibilità e ripetibilità 10.6% e 4.2%, 9.0% e 2.8%, 11.7% e 6% per L, H e P, rispettivamente; recupero medio 100% (range 93-111%); linearità buona ($R^2=0.99$; $y=-127.03x+138.13$) nell'intervallo 8.8-143 pM; limite di rilevabilità pari a 0.05 pM. I nostri dati mostrano che il metodo testato è attendibile ed utilizzabile per scopi routinari sull'analizzatore AxSYM. Va tuttavia dimostrata la sua utilità diagnostica come nuovo marker di una carenza acquisita di B12 in varie patologie.

Bibliografia. H Refsum et al, Clin Chem 2006;52:129-37

256

VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI DEL NUOVO SISTEMA DI CHIMICA CLINICA ADVIA 1200 (BAYER) E STUDIO DI CORRELAZIONE CON VITROS 5.1/FS (ORTHO) SU CAMPIONI DI SIERO ED URINA

B. Milanese¹, G. Cocchi¹, E. Bernardi¹, C. Mancin¹, S. Fornari¹

¹Laboratorio di Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero di Desenzano del Garda, Azienda Ospedaliera di Desenzano, Desenzano del Garda (BS)

Scopo. Con questo studio abbiamo valutato le prestazioni analitiche del nuovo Sistema di Chimica Clinica ADVIA 1200 (Bayer Diagnostics) allo scopo di stabilire la tipologia di laboratorio più indicata al suo utilizzo ed il suo più appropriato impiego.

Materiali e Metodi. ADVIA 1200, che si aggiunge alla strumentazione Bayer per la chimica clinica (ADVIA 1650 e 2400), è un analizzatore di tipo discreto, ha una produttività di 1200 test/ora (800 colorimetri più 400 ISE) e applica la tecnologia dei microvolumi (volume totale di reazione mediamente compreso tra 80 e 120 µl). La valutazione è stata condotta su 25 analiti (11 substrati, 7 enzimi, 4 ioni, 3 ISE) scelti tra i più frequenti nella routine di chimica. I reagenti utilizzati sono comuni a tutti i sistemi della linea ADVIA di chimica clinica e sono per la quasi totalità liquidi e pronti all'uso. Nello studio si sono volute approfondire quelle caratteristiche operative che rappresentano il primo impatto tra l'Operatore e il sistema analitico. Oggetto quindi della nostra indagine: precisione su siero ed urina, sensibilità analitica, eventuale presenza di contaminazione (carry-over) tra campioni, correlazione con il nostro Sistema utilizzato per la routine Vitros 5.1/FS (Ortho Clinical Diagnostics), produttività reale espressa come rapporto campioni dosati/tempo.

Risultati. I risultati ottenuti evidenziano un'eccellente precisione. CV% per i campioni di siero compresi tra l'1,21% (Calcio a 8,8 mg/dL) e il 4,89% (Bilirubina Diretta a 0,67 mg/dL) e CV% delle urine compresi tra 0,68% (Cloro) e il 2,79% (Urea). Abbiamo evidenziato anche una buona sensibilità analitica e l'assenza di carry-over tra campioni. Ottima anche la correlazione con i metodi attualmente in su routine Vitros 5.1/FS che hanno mostrato coefficienti di correlazione ($r \geq 0,912$). La produttività reale complessiva è risultata di 95 campioni/ora per una richiesta media di 13 test per campione (3 ISE compresi).

Conclusioni. Le eccellenti prestazioni analitiche e l'alta produttività del Sistema ADVIA 1200 lo rendono particolarmente indicato in laboratori con routine di chimica clinica di medi volumi come "backup" per grandi analizzatori.

257

LA CHIMICA SECCA: DOSAGGIO DEL COLESTEROLO HDL SENZA PRETRATTAMENTO. VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA E DEI VALORI DI RIFERIMENTO

M. C. Zuccaro¹, A. D'Incecco¹, C. D'Ortona¹, F. Massimini¹, C. Romano¹

¹Laboratorio Analisi, P.O. SS. Annunziata, Chieti

Scopo. Il lavoro mette a confronto due tecniche in chimica secca per il dosaggio del colesterolo hdl (1). La prima, in uso nel laboratorio da oltre 5 anni, prevede la separazione delle frazioni non hdl per attrazione magnetica. La seconda tecnica, di nuova generazione, prevede il dosaggio direttamente dal campione primario di siero. Entrambe le tecniche sono utilizzate su sistemi Vitros. Oltre a valutare la concordanza analitica su un gruppo campionario di 386 casi in modo random, il lavoro vuole verificare i valori di riferimento proposti dalla ditta su un gruppo campione di 100 donatori sani del bacino di utenza afferente al P.O. Clinicizzato S.S. Annunziata di Chieti.

Materiali e Metodi. Analizzatore Vitros 950 della ditta J e J.

Metodo in Uso. Separazione per attrazione magnetica con cloruro di magnesio e solfato di destrano.

Metodo diretto. Utilizza una lastrina multistrato con acido fosfotungstico e cloruro di magnesio per la separazione delle frazioni non hdl.

386 campioni di siero divisi in tre sottogruppi: Ospedalizzati, Donatori e Ambulatoriali.

Analisi statistica non parametrica. Test di Wilcoxon.

Risultati e Conclusioni. L'analisi della concordanza analitica, test di Wilcoxon, mostra una differenza significativa ($N=386; Z=-7.194, P=0.00$) ed il test di Skewness una distribuzione non parametrica dei dati. La valutazione dei valori di riferimento è stata eseguita sul gruppo campione dei donatori ($N=137; M=96, F=41$), la distribuzione non gaussiana ci ha indotto ad utilizzare il 95% centrale che nel gruppo in oggetto, senza distinzione di sesso, è compreso fra 33.4 mg/dL e 88.6 mg/dL.

L'analisi ulteriore dei dati per la verifica statistica della differenza fra sesso ha evidenziato una netta separazione dei gruppi M e F.

Nel nostro caso i limiti sono $M= 31.85-78.73$ mg/dL e $F= 39.1-97.6$ mg/dL utilizzando sempre il 95% centrale della distribuzione non parametrica.

La valutazione dei valori di riferimento sarà ulteriormente verificata su una campionatura maggiore che potremo estrarre dal LIS nel corso dell'anno corrente.

258

METODO IMMUNOTURBIDIMETRICO ED IMMUNONEFELOMETRICO NEL DOSAGGIO DELLA TRANSFERRINA

D. Vandini¹, G. Bianchi¹, E. Pazzaglia¹, O. Stocchi¹

¹U.O. Laboratorio Analisi, Ospedale ASUR Zona 2, Urbino (PU)

Introduzione. La Saturazione della Transferrina è un esame di notevole importanza, poichè è l'esame di 1° livello per l'Emocromatosi di tipo 1,2 e3.

Obiettivi: valutare la performance analitica del dosaggio immunoturbidimetrico con il sistema Vitros FS 5,1 (ORTHO CL. DIAGN.); mettere a confronto i risultati ottenuti dal dosaggio con metodo turbidimetrico con quelli nefelometrici (DADE-BEHRING) (in uso); verificare se i dati di questo lavoro comportano il potere decisionale circa la scelta del metodo e del modello operativo.

Materiali e Metodi. Sieri di controllo Bio-Rad a 2 livelli ; 40 cp di pazienti; Vitros5,1/FS, BNII DADE-B.; Tabelle per traguardi analitici, I%,B%,TE%; Regressione Lineare, t di Student, Analisi delle Differenze, Grafico Bland-Altman.

Risultati. Il metodo turbidimetrico ha evidenziato nel Bio-Rad 2 una precisione mostrante nella ripetibilità CV%=1,49 e DS= 3,96 e nel Bio-Rad 3 CV%=1,3 e DS=4,4; nella riproducibilità tra serie, per Bio-Rad 2 CV%=1,3 e DS=3,4 tra giorni, CV%=0,73 e DS=2,64; per Bio-Rad 3 tra serie CV%=1,6 DS=5,5 tra giorni CV%=1,5 DS=5,1. Le carte di Levey-Jennings mostrano i valori entro i limiti di allarme e non ci sono tendenze sistematiche. Per Biorad 2 si ha Bias=6% e per Biorad 3 Bias=4%. Il metodo nefelometrico ha evidenziato: Bio-Rad 2 CV%=2,9, DS=7,9 e Bias=10%; Bio-Rad 3 CV%=2,5, DS=8,6 e Bias=5%. Indice di correlazione r=0,997. Il t di Student ha fornito una p<0,00001; l'analisi delle differenze dà una media delle differenze d=5,3 e una DS delle stesse DSd=7,95. Il grafico di Bland-Altman ha rilevato una variazione della media entro l'intervallo di confidenza non clinicamente rilevante.

Conclusioni. I valori di CV% e di Bias ottenuti attestano che il metodo turbidimetrico è dotato di notevole attendibilità analitica nel dosaggio della Transferrina. I modelli statistici utilizzati per verificare il comportamento dei sistemi sulla stessa coorte di campioni dimostrano che questi sono correlabili, intercambiabili, commutabili. Emerge che il sistema turbidimetrico offre il vantaggio di includere il parametro nella stessa linea automatica di Ch. Clinica quindi nella stessa provetta, nella stessa seduta analitica e nello stesso settore con conseguente risparmio di costi, di personale e di tempo.

259

ANALYTICAL EVALUATION OF A NEW IMMUNONEPHELOMETRIC METHOD FOR HOMOCYSTEINE MEASUREMENT

B. Zappacosta¹, S. Persichilli², A. Minucci², D. Scribano², M. Antenucci², S. Fasanella², P. Neri², B. Giardina², P. De Sole²

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 and objectives. Increased plasma homocysteine, a sulphur aminoacid closely related to methionine metabolism, is considered an independent risk factor for cardiovascular diseases. Over the last years, the request to clinical laboratories for homocysteine measurement is constantly increased and, for this reason, several new methods have been developed, mainly with the aim of using them on completely automated instruments for routine analyses.

In this paper we evaluated a new immuno-nephelometric method for homocysteine determination on the Dade Behring BNII nephelometer.

Methods. Linearity, recovery, limit of detection (LOD), total imprecision, reference interval were assessed; moreover the method was compared with a HPLC reference method and with an automated immunoassay method (AxSYM Abbott).

Results. Recovery was higher than 94%, LOD was 0.5 µmol/L, total imprecision ranged from 5.0 to 7.6%. For the comparison study, the immuno-nephelometric method showed a good correlation both with HPLC ($Y = 1.02X - 0.79$; $R^2=0.99$) and with the AxSYM method ($Y = 1.003X+0.06$, $R^2=0.98$).

Conclusion. The new nephelometric method from Dade Behring, for its analytical performance can be easily considered a suitable method for homocysteine routine measurement; moreover, it can't be ruled out that the widespread availability of nephelometers in clinical laboratories play a leading role in the choice of this method.

Reference. Refsum H, Smith AD, Ueland PM et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. Clin Chem. 2004;50:3-32.

260

INFLUENCE OF MENOPAUSAL STATUS AND BODY FAT DISTRIBUTION ON OXIDATIVE STRESS

C. Cervellati¹, A. Guariento¹, A. Bernardi², C. Guaraldi², C. Bonaccorsi², C. Castaldini², F. S. Pansini², G. Mollica¹, B. Bagni², C. Bergamini¹

¹Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare, Univ. degli St. di Ferrara, Ferrara

²Cen. di Servizio e Ricerca per lo studio della Menopausa e Osteoporosi, Univ. degli St. di Ferrara, Ferrara

³Cli. Ostetrica Ginecologica, Univ. degli St. di Ferrara, Ferrara

Background. Recent studies evidenced a key-role of oxidative stress (OS) in the pathogenesis of CV diseases (1). These diseases occur with increased frequency in postmenopausal women, possibly in association with overall, mainly abdominal, fat accumulation.

Objectives. We investigated in 100 women the influence of menopausal status on body fat distribution and its correlation with OS.

Methods. Total and regional body fat was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Sera from all subjects were employed for colorimetric assessment of hydroperoxides concentration (D-Roms test) and total antioxidant power (TAP), by a ferric reduction (FRAP) technique. Antioxidant contributions by thiol groups and uric acid (UA) were assessed by 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid reaction and by an enzymatic assay employing Uricase, respectively

Results. Oral contraceptive users were excluded a posteriori from the study due to a highly significant increase of hydroperoxides ($p < 0.00001$). Independently of age, menopausal transition leads no significative change in hydroperoxides, whereas TAP in the perimenopause increases ($p < 0.001$) with the partial contribution of UA ($p < 0.05$). After adjustment for age, hydroperoxides result positively associated with total (TF) and abdominal (AF) fat mass with similar p value ($P < 0.05$). More significantly TF and AF correlated positively with TAP ($p < 0.0001$ and $p < 0.00001$, respectively).

Discussion. The menopausal transition does not appear to have a reliable relationship with OS. Nevertheless a possible role of estrogen in mechanism which accounts for the origin of OS is suggested by the increase of antioxidant defence in perimenopause and the enhancement of OS as effect of exogenous hormones in contraceptive pill. The direct proportionality between OS and amount of body fat mass may be explained by the increased availability of lipid, essential for the amplification of oxidative signals.

Reference. Van Gaal, et.al. (1998). *Atherosclerosis*, 137, S39-S44

261

TEST AL VERDE INDOCIANINA: VECCHI METODI PER NUOVE APPLICAZIONI

E. Di Stasio¹, B. E. Annicchiarico², F. Romitelli¹, S. Baroni¹, L. Gonzalez¹, M. Siciliano², C. Zuppi¹

¹Ist. di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Ist. di Patologia Medica e Semeiotica Medica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

La valutazione preoperatoria della funzionalità epatica è fondamentale per stabilire il tipo di approccio chirurgico tollerabile dai singoli pazienti. I criteri per delineare l'entità della resezione dipendono dalla classificazione di Child-Pugh o, di crescente applicazione, dal risultato del test di ritenzione al verde indocianina (ICG). Tale sostanza, di facile identificazione tramite lettura spettrofotometrica, dopo iniezione endovenosa, è rapidamente veicolata dalle proteine plasmatiche al fegato che provvede alla captazione e successiva escrezione nella bile. Il test prevede la misura delle concentrazioni residue in circolo e la determinazione della velocità di eliminazione, proporzionale alla massa epatica funzionante. Il test è considerato applicabile solo in condizioni di compenso epatico (bilirubina < 1.1 mg/dL ed assenza di ascite) e in assenza di concomitanti fattori che potrebbero interferire con la velocità di scomparsa del colorante dal circolo ematico quali la presenza di liquidi extravascolari e alterazione delle proteine plasmatiche.

Nel presente lavoro è proposta una differente tempistica di prelievo ed introdotto un algoritmo avanzato di analisi dei dati che consente di estrapolare due principali parametri: la concentrazione residua a 15 minuti (ICG15%), indice classicamente utilizzato negli algoritmi chirurgici per la determinazione dell'entità di resezione epatica che il paziente è in grado di tollerare, e la clearance dell'ICG, determinata dall'integrale sotteso dalla curva di escrezione. La cinetica classica di eliminazione mostra un decadimento di tipo mono-esponenziale applicabile solo in condizioni di compenso epatico; modelli più complessi devono essere applicati in caso di ridistribuzione del tracciante in liquidi extravascolari e alterazioni della proteinemia.

L'analisi integrata dei due parametri e del tipo di cinetica potrebbe consentire una più precisa valutazione della funzionalità epatica e permettere l'applicazione del test anche in pazienti non indirizzati a interventi chirurgici ma con possibili approcci terapeutici alternativi (radiointerventista o di chemoembolizzazione).

Bibliografia. Miyagawa S et al. "Criteria for safe hepatic resection" *Am. J. Surg.* (1995) 169:589-94.

262

VALUTAZIONE DEL RUOLO DELLE IgE SPECIFICHE IN SOGGETTI DI ETÀ PEDIATRICA

C. Giovanetti¹, N. Di Pietro¹, M. Polidori¹, R. Carosella¹, E. De Marco¹

¹Lab. Analisi, Osp. G. Bernabeo, Ortona (CH)

Introduzione. L'allergia è caratterizzata in rapporto all'età da un percorso definito sia nel livello di produzione delle IgE verso allergeni specifici sia nelle manifestazioni sintomatiche.

Le concentrazioni sieriche degli anticorpi IgE aumentano progressivamente fino ai 10anni per stabilizzarsi fra i 15-20anni sui valori dell'adulto.

Se i livelli superiori di IgE Totali supportano la diagnosi di allergia, i valori normali non la possono escludere.

Lo studio si è rivolto a soggetti di età pediatrica(0-18anni), con sospetto diagnostico di allergia, sottoposti a test in vitro per le IgE Totali e Specifiche Inalanti e/o Alimenti.

Metodologia. 410 pazienti sono stati divisi in fasce di età(0-12mesi;1-3/4-6/7-10/11-18anni); per ciascuna si è utilizzato il valore(kU/L) delle IgE Totali(tIgE) come cut-off di positività e si è valutata la sensibilizzazione con il dosaggio quantitativo(kU_A/_L) delle IgE Specifiche Inalanti e Alimenti(sIgE I-A).

I livelli sierici delle tIgE e sIgE sono stati dosati con il sistema ImmunoCAP, Total IgE e Specific IgE(Phadia) ed eseguita con lo strumento UniCAP100.

Risultati. Per ogni fascia di età si è calcolata la percentuale di pazienti positivi per le tIgE e sottoposti al dosaggio delle sIgE I-A.

Il 52% è positivo per le tIgE, di questi il 33% positivo ad almeno un allergene; il 30% negativo agli allergeni di base, mentre il 37% non è stato sottoposto a test di screening per le sIgE I-A.

Una percentuale di pazienti negativi alle tIgE è positiva ad almeno un allergene: le sIgE-I positive passano dal 5%(1-3a) al 17%(7-10a); le sIgE-A positive non superano il 4-5%(7-10a, 0-12m).

I dati confermano uno shift delle IgE contro gli alimenti(sIgE-I. 19%; sIgE-A 19%, 1-3a) verso IgE di tipo Inalante(sIgE-I 32%; sIgE-A 0%; 11-18a). Fra gli allergeni inalanti evidenziati quelli maggiormente responsabili sono gli Acari per il 56% e le Graminacee per il 26%.

Conclusioni. Pertanto l'utilizzo del dosaggio quantitativo delle IgE Specifiche come test di screening è fondamentale per la diagnosi di allergia in quanto predice l'insorgenza di patologia prima della sua manifestazione.

Bibliografia. Yunginger JW et al. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(6):1007-84

263

INDAGINE CONOSCITIVA SULL'UTILIZZO DEI MARCATORI BIOCHIMICI DI RIMODELLAMENTO OSSEO PER IL GRUPPO DI STUDIO SIBioC MARCATORI BIOCHIMICI DI RIMODELLAMENTO OSSEO (GdS-MBRO)

F. Pagani¹, G. Bonetti¹, M. Cristoferi², A. Vernocchi³, M. Vitillo⁴, C. Zuppi⁵, M. Zaninotto⁶, M. Panteghini⁷

¹A.O. Spedali Civili, Brescia

²A.U.S.L., Valle d'Aosta

³A.U.S.L., Forlì

⁴A.C.O. San Filippo Neri, Roma

⁵Policlinico Gemelli, Università Cattolica, Roma

⁶A.O., Padova

⁷Università degli Studi, Milano

Il GdS-MBRO ha inviato nello scorso mese di Febbraio un questionario conoscitivo relativo all'impiego dei MBRO al quale hanno risposto 67 laboratori distribuiti su tutto il territorio nazionale (Nord 66%; Centro 22%; Sud ed Isole 12%). Riguardo alla disponibilità del dosaggio dei MBRO, più della metà dei laboratori (55%) già prevede la loro determinazione, il 6% intende attivarla entro breve, mentre il 39% non li misura. Il marcatore di osteoformazione maggiormente impiegato è l'osteocalcina (OC) (nel 78% dei laboratori), seguito da fosfatasi alcalina ossea (BALP) (73%). Il marcatore di riassorbimento osseo più impiegato è rappresentato dai crosslinks del piridinio (CL) (49%), seguito dal telopeptide C-terminale del collagene I (CTX-I) (30%). I marcatori di riassorbimento sono prevalentemente determinati su campioni di urina (66%). La maggioranza dei laboratori (78%) associa la determinazione di uno o più marcatori di formazione con uno o più marcatori di riassorbimento. Riguardo al numero di determinazioni eseguite circa la metà dei laboratori ne esegue meno di 50 al mese. Relativamente ai metodi impiegati per il dosaggio, per BALP la maggioranza dei laboratori impiega metodi immunologici, mentre l'11% impiega metodi elettroforetici; per OC i laboratori che impiegano metodi immunologici diretti verso la molecola intatta sono il 28%, mentre il 45% utilizza metodi che rilevano sia la proteina intatta che il frammento N-MID; per CL il dosaggio viene effettuato con saggi immunologici nel 79% dei casi e con HPLC nel 22%; infine, CTX-I e telopeptide N-terminale del collagene I (NTX-I) vengono determinati con metodi immunologici. Riguardo alla tipologia dei reparti richiedenti prevalgono le richieste provenienti da Medicina Generale (85%), seguite da Endocrinologia (63%), Ortopedia (48%), Ginecologia (45%), Nefro-urologia (25%), Gastroenterologia (18%), Oncologia-radioterapia (10%) e Reumatologia (8%). A margine dell'indagine, si può concludere che, sebbene siano numerosi i laboratori interessati all'argomento, necessitano senza dubbio ulteriori studi ed approfondimenti sia delle problematiche metodologiche che dell'applicazione clinica dei MBRO.

264

DETERMINAZIONE DEL NUMERO DI SPERMATOZOI NEL LIQUIDO SEMINALE CON STRUMENTO UF-100 SISMEX

G. Previtali¹, M. Toscani¹, M. Amadei¹, S. Bussaconi¹, M. Donati¹, G. Frati¹, A. Rapalli¹, P. Rossetti¹, A. Turini¹

¹Lab.di Biochimica Clinica e Microbiologia, Osp. di Vaio AUSL di Parma, Fidenza (PR)

Introduzione. La determinazione del numero di spermatozoi è un parametro fondamentale nella determinazione dello stato di fertilità di un individuo. Il metodo utilizzato normalmente è la lettura al microscopio ottico. L'osservazione al microscopio ottico, le caratteristiche delle camere di conteggio e la notevole manualità sono fonte di imprecisione. Da queste osservazioni nasce l'esigenza di un metodo standardizzato e automatizzato che minimizzi le variabili individuali nell'esecuzione del test riducendo contemporaneamente il notevole dispendio di tempo che richiede la sua esecuzione.

Scopo della Ricerca. Valutare la possibilità di impiego della citometria a flusso nella determinazione del numero di spermatozoi nel liquido seminale.

Materiali e Metodi. Abbiamo determinato il numero di spermatozoi in trenta campioni di liquido seminale. I campioni sono stati diluiti 1:20 con una soluzione al 5% di NaHCO₃ e formalina e quindi analizzati al microscopio ottico in camera di Thoma. Tutti i campioni diluiti 1:20 e 1:40 sono stati valutati sul citometro a flusso UF-100 (SISMEX TOA distribuito da Dasit), luce laser del tipo argon, con colorante bicomponente: fenantridina e carbocianina.

Risultati. Sono state valutate le letture solo sulla banda spermatozoi del citogramma.

La classe più frequente nelle letture al citofluorimetro è stata quella compresa fra 4.04 e 32.04 milioni di spermatozoi con undici casi e una frequenza del 36.6%.

La classe più frequente nelle letture in microscopia ottica è stata quella compresa fra 6.4 e 31.4 milioni di spermatozoi con dodici casi ed una frequenza del 40%.

I valori ottenuti sono stati analizzati con il metodo della regressione lineare ottenendo un coefficiente di correlazione di 0.962 utilizzando un fitting polinomiale di grado 1.

Discussione. L'indice di correlazione ($r = 0.962$) e la buona sovrapposizione di dati nella classe più numerosa e critica (4-32 milioni di spermatozoi) incoraggiano nello studio del citometro, come alternativa alla lettura ottica, nella conta standardizzata degli spermatozoi.

Bibliografia. Linee guida metodologiche per la standardizzazione delle procedure dell'esame del liquido seminale. 7-8 Novembre 2003 Università di Roma "La Sapienza".

265

ANALISI COMPARATIVA DEL DOSAGGIO DI NITRITI E NITRATI MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA, HPLC E METODO DI GRIESS

F. Romitelli¹, A. M. Amorini¹, S. D'Alia¹, A. S. Santini², J. Gervasoni¹, B. Tavazzi¹, E. Di Stasio¹

¹Ist. di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

La quantificazione indiretta della produzione endogena di ossido nitrico è possibile attraverso il dosaggio dei suoi metaboliti più stabili (nitriti e nitrati), effettuabile mediante tecniche di determinazione basate su differenti principi analitici (spettrometria di massa - GC-MS, HPLC, metodo di Griess, etc.). Le principali discrepanze tra i livelli di nitriti/nitrati dosati attraverso metodo Griess rispetto a quelli determinati mediante tecniche più accurate di spettrometria di massa, sembrano derivare da fenomeni di interferenza ottica dovuti principalmente a fenomeni di aggregazione/precipitazione proteica. Differenti protocolli di deproteinizzazione sono stati testati su 31 campioni sierici di soggetti sani e successivamente è stato effettuato il dosaggio dei nitriti/nitrati con metodica Griess, GC-MS e HPLC. I risultati ottenuti dimostrano che il metodo di deproteinizzazione con solventi organici quali acetone e cloroformio è il più efficace nella rimozione proteica dei campioni (contenuto proteico residuo <1% dell'iniziale) e che le concentrazioni di nitriti/nitrati determinate attraverso il metodo Griess integrato con tale metodica risultano ben correlate con quelle ottenute mediante HPLC ($r^2=0.96$) e GC-MS ($r^2=0.95$). Tali risultati supportano la validità dell'utilizzo del metodo di Griess, rapido, economico e di facile applicazione nella pratica clinica di laboratorio, per il dosaggio su numeri elevati di campioni di nitriti/nitrati nei liquidi biologici. Al contrario qualsiasi ipotesi, conclusione ed inquadramento fisiopatologico deve essere supportato dalla determinazione dei metaboliti intermedi del ciclo dell'L-arginina/ossido nitrico ottenibile solo con tecniche più sofisticate e raffinate quali la spettrometria di massa e l'HPLC.

Bibliografia. Tsikas D. "Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids." Free Radic Res. (2005)39(8):797-815.

266

EFFETTO DI MONOMERI METILACRILICI SULLA FUNZIONALITA' GRANULOCITARIA E MONOCITARIA

C. Rossi¹, P. De Sole¹, A. Lupi², F. De Palma¹, G. Nocca¹

¹Lab. Biochimica Clinica, Pol. A. Gemelli, Università del Sacro Cuore, Roma

²ICRM, CNR, Roma

Il diuretano-dimetilacrilato (DUDMA) ed il butandiolo-dimetilacrilato (BDDMA) sono monomeri presenti nelle resine composite per uso odontoiatrico e subiscono polimerizzazione durante l'applicazione clinica; poiché la reazione non è mai completa, essi vengono in parte rilasciati nel cavo orale o nei fluidi biologici e per tale motivo la loro biocompatibilità è oggetto di numerosi studi. Con il presente lavoro si è voluto valutare l'effetto dei suddetti composti sulla funzionalità dei granulociti polimorfonucleati e dei monociti/macrofagi isolati da sangue periferico tramite l'analisi del burst ossidativo(BO).

Materiali e Metodi. Tramite chemiluminescenza (CL) è stata misurata la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di fagociti stimolati con forbolo 12-miristato 13-acetato o con zymosan opsonizzato. I monomeri, a concentrazioni decrescenti, sono stati messi a contatto con le cellule; la vitalità cellulare è stata determinata, dopo 1 h, tramite colorazione con trypan blue e la quantità di ROS prodotta dalle cellule (sia non stimolate che stimolate) è stata valutata per un periodo di 2 h. I risultati degli esperimenti, ripetuti in triplicato per sei volte, sono stati espressi come media * SEM; le medie sono state comparate mediante ANOVA e $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

Risultati e Conclusioni. I monomeri studiati non hanno mostrato una diretta azione citotossica ma i risultati indicano che la luminescenza basale dei granulociti decresce significativamente quando la loro concentrazione aumenta. Inoltre mentre il DUDMA riduce anche il BO, il BDDMA non mostra alcun effetto su tale parametro e ciò riveste particolare interesse non solo in campo odontoiatrico. Per quanto riguarda i monociti/macrofagi, i risultati ottenuti mostrano una riduzione del BO indotta dai monomeri senza nessun effetto significativo sulla produzione basale di ROS. Poiché il perossido d'idrogeno - prodotto durante il BO - è coinvolto nell'attivazione di geni deputati alla produzione di interleuchine, una diminuzione di tale processo potrebbe compromettere a vari livelli le funzioni dei monociti/macrofagi comportando un potenziale rischio per il recupero della funzionalità del tessuto danneggiato.