

SIBioC 2007
39° Congresso Nazionale
Società Italiana di Biochimica Clinica e
Biologia Molecolare Clinica

Riassunti Poster

Codice Poster	Argomento
• 001 - 005	Analisi decentrate
• 006 - 007	Applicazioni informatiche
• 008 - 013	Automazione e gestione del laboratorio
• 014 - 039	Biologia molecolare
• 040 - 046	Coagulazione
• 047 - 062	Controllo e gestione della qualità
• 063 - 069	Diabete
• 070 - 088	Ematologia
• 089 - 097	Endocrinologia
• 098 - 113	Farmacologia e tossicologia
• 114 - 126	Immunologia, autoimmunità
• 127 - 130	Immunometria
• 131 - 134	Lipidi, lipoproteine
• 135 - 149	Marcatori cardiaci
• 150 - 160	Marcatori di neoplasia
• 161 - 169	Medicina e sport
• 170 - 188	Proteine ed enzimi
• 189 - 217	Studi clinici
• 218 - 244	Valutazione di strumenti e prodotti
• 245 - 254	Varie

Nota dell'Editore: i riassunti sono stati riprodotti senza alcuna revisione editoriale dal materiale direttamente fornito dagli autori.

BIANCA

001

IMPLEMENTAZIONE DI UN SISTEMA DI MONITORAGGIO DELLA GLICEMIA NEI REPARTI DI DEGENZA, COLLEGATO AL LABORATORIO ANALISI E ALLA CARTELLA CLINICA INFORMATIZZATA. PROGETTO PILOTA

M. Casati¹, C. Delfini¹, G. Vegetti¹, S. Pittalis¹, V. Perlangeli¹, L. Carati¹, D. Cerri², W. Corti³, F. Paleari³, G. Genduso⁴

¹U.O. Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, A.O. S. Gerardo, Monza

²U.O. Farmacia, A.O. S. Gerardo, Monza

³U.O. Clinica Medica, A.O. S. Gerardo, Monza

⁴Direzione Sanitaria, A.O. S. Gerardo, Monza

Scopo del lavoro. Annualmente sono eseguite presso le UU.OO. di degenza della nostra A.O. 300.000 determinazioni della glicemia con 90 glucometri, da parte di 800 operatori. Questa mole di dati, ad elevato impatto sulla salute del paziente, presenta gravi lacune in termini di tracciabilità, validazione analitica e monitoraggio strumentale da parte del Laboratorio Analisi, addestramento e verifica degli operatori. Nell'ambito della gestione del Risk Management, il progetto si prefigge di eliminare queste lacune mediante l'implementazione di nuovi glucometri e di un sistema informatico che permettano la gestione e la tracciabilità delle glicemie inserite nella cartella clinica informatizzata, l'addestramento e abilitazione all'uso degli operatori.

Metodi. Sono stati utilizzati: per le misure 2 glucometri Accu-check Inform (Roche Diagnostics); per il monitoraggio degli strumenti, la gestione dei dati e la tracciabilità dei risultati i software AstrolabPOC (Roche Diagnostics), DNLab e Itaca cs (Noematica). Il laboratorio ha gestito la validazione strumentale, la configurazione dello strumento e il monitoraggio della qualità analitica, l'addestramento e abilitazione degli operatori alle fasi pre-, post- e analitiche.

Per eseguire una misura è obbligatorio che: l'operatore sia abilitato informaticamente all'uso e identificato tramite la matricola, il glucometro abbia superato il Controllo di Qualità entro le 24h dall'ultima verifica, il paziente sia identificato correttamente con il codice di ricovero presente sul braccialetto applicato al polso. Per valori critici è obbligatorio l'inserimento di un commento. Il progetto pilota si è limitato all'U.O. di Clinica Medica.

Risultati. Sono stati addestrati e abilitati 53 operatori. In un mese sono state tracciate 906 glicemie di cui 79 non identificate; 183 con commenti, di cui 58 inappropriati. Gli errori sono riferibili a 4 operatori, ricontattati per una revisione della competenza. Eliminati gli errori di trascrizione.

Conclusioni. Il sistema implementato permette di tracciare e controllare le fasi, pre- e post- e analitiche del monitoraggio della glicemia intraospedaliera. I risultati incoraggianti depongono per l'estensione alle altre UU.OO.

Bibliografia

Carmignoto F et al. *Biochim Clin* 28:563,2004

002

POINT-OF-CARE BLOOD GAS SYSTEMS: QUALITY ASSURANCE ACCORDING TO CLINICAL PATHOLOGY ACCREDITATION AND INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION 9000-2001 STANDARDS

M. Petronelli¹, V. Brescia¹, L. Varraso¹, F. Catacchio¹, S. Marsico¹, P. Mastrodonato¹, F. Di Serio¹

¹U.O. Patologia Clinica I, Policlinico Bari

The organization model of the Point-of-Care for cardiac markers implemented in the cardiology departments at our institution, resulted to comply with the highest quality standards thus meriting the Clinical Pathology Accreditation/CPA certificate of accreditation and the certification according to the International Standard Organization/ISO 9000-2001. In light of the results obtained, this model has been extended to decentralised systems for blood gas analysis.

The process was divided into phases:

- Sharing of objectives with institutional bodies
- Information Technology implementation
- Identification of workgroups: roles and responsibilities
- Training for the clinical staff
- Drawing up protocols concerning the phases of the process

In this initial phase the following objectives were achieved:

- Standardization of the pre-analytical phase (collection, identification, transport of samples)
- Standardization of the analytical phase (quality control choices and execution times)
- Standardization of the post-analytical phase (reporting, data storage)

The integration of the POCT management system with the LIS is being implemented in order to allow the univocal files of patients data. The blood gas was historically the first POCT, always bound by controls by the central laboratory, chosen and managed independently by clinics. Becoming part of a consolidated organizational context and bringing about radical changes is our challenge to guarantee the quality of results wherever they are produced. National and international bodies will tell us if the objective was achieved.

003

MONITORAGGIO IN RETE DEI GLUCOMETRI OSPEDALIERI. RISULTATI DOPO I PRIMI 8 MESI DI ATTIVITÀ

P. Carraro¹, N. Di Vitofrancesco¹, E. Babetto¹, C. Tirabosco¹, M. Plebani¹

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

Vi è generale consenso sulla raccomandazione che il controllo dei pazienti diabetici in ambiente ospedaliero sia eseguito su sangue intero mediante glucometri portatili. Tale attività va svolta sotto la supervisione e la responsabilità del Laboratorio. Per consentire un'efficace e tempestiva verifica degli strumenti, da 8 mesi è stata installata presso l'Azienda Ospedaliera di Padova una rete di controllo remoto sia delle analisi che del controllo di qualità. Abbiamo valutato i risultati sia in termini di prestazioni analitiche che di rischio clinico.

Sono stati installati 54 strumenti Accu-Chek Inform (Roche Diagnostics) in 21 reparti di cura, dotati di "dock station" collegata alla rete ospedaliera e di lettore di barcode per la lettura del codice nosografico del paziente. Presso l'Information Technology è stato installato un server dotato dell'applicativo "Cobas IT 1000" (Roche Diagnostics). Tutti gli operatori sono stati addestrati all'impiego dei nuovi glucometri ed è stata raccomandata la misura quotidiana di due livelli di controllo al giorno. Gli strumenti vengono automaticamente bloccati allo scadere di 48 ore dall'ultimo controllo.

Le prestazioni analitiche sono state in linea con quanto era atteso: il bias, calcolato sulla media dei risultati di un mese rispetto alla media di consenso dell'intera installazione è sempre inferiore al 5% sia sul livello 1 (x=55 mg/dl) che sul livello 2 (x=302,2 mg/dl). L'imprecisione tra serie ha mostrato un valore medio di CV 5,3% (range 2,7-7,4) e CV 3,6% (range 1,7-5,2) rispettivamente. La stretta sorveglianza del controllo di qualità, insieme al supporto offerto dal settore POCT del Laboratorio ha permesso di identificare 3 casi in cui le strisce reattive erano inaffidabili per errore di conservazione.

In conclusione abbiamo dimostrato una qualità analitica in linea con lo stato dell'arte e con le raccomandazioni scientifiche. Il ruolo del laboratorio si è dimostrato essenziale alla riduzione del rischio clinico legato all'impiego di metodiche decentrate.

Bibliografia

Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem. 2002;48:436-72.

004

ESPERIENZA DI UNA GESTIONE CENTRALIZZATA DEI POC PRESSO L'AZIENDA OSPEDALIERA VILLA SCASSI

R. Capuzzo¹, E. Cammardella¹, P. Ciacci¹, I. Pastorino¹

¹Lab. di Chimica Clinica e Microbiologia, Az. Ospedaliera Villa Scassi, Genova

Obiettivi. L'affermarsi della pratica diagnostica presso i reparti ha portato ad una progressiva necessità di decentralizzazione del laboratorio di analisi.

Al fine di mantenere un elevato livello qualitativo delle analisi decentrate, i laboratori devono porre la massima attenzione a tutti gli aspetti che permettano di avere un sufficiente controllo degli strumenti analitici installati presso i reparti, spesso gestiti da personale non specializzato.

Metodi. Attraverso lo sviluppo di adeguati sistemi informatici di collegamento e la disponibilità di sistemi analitici di alto profilo tecnologico sarà quindi possibile una costante verifica delle prestazioni strumentali ed una gestione del Controllo Qualità. Il raggiungimento di questi obiettivi si persegue attivando un processo di centralizzazione e monitoraggio delle attività periferiche attraverso un collegamento via intranet, o VPN, con collegamento di tutti gli strumenti installati. L'integrazione del sistema informatico di laboratorio (LIS) al software di controllo remoto degli analizzatori, garantisce la tracciabilità dei dati analitici ed anagrafici prodotti.

Risultati. Gestione centralizzata dell'operatività e QC., ricerca guasti da postazione remota (accertamento del problema > 90%), risoluzione dei problemi senza sopralluogo, maggiori informazioni sullo stato funzionale degli strumenti, portano ad un risparmio > 60% in termini di tempo, impegno e lavoro. Si ottiene inoltre la completa tracciabilità dei dati prodotti in ordine ad analisi paziente, QC, calibrazioni manutenzioni eseguite.

Conclusioni. Tutto ciò consente di seguire l'attività dei reparti e di applicare la medesima gestione operativa del Laboratorio Centrale, di ridurre i tempi di non operatività degli strumenti, di ridurre l'impegno orario del personale tecnico del laboratorio dedicato alla manutenzione ed al primo intervento. Inoltre consente l'archiviazione dei risultati nell'archivio informatizzato del laboratorio diventando quindi parte integrante della cartella clinica informatizzata del paziente.

Bibliografia

P. Capelletti la logica organizzativa del point of care testing: gli elementi per la progettazione Riv Med Lab-JLM, Vol 2, N 1, 2001

005

L'ESECUZIONE DELL'EMOGASANALISI IN AMBULANZA MEDIANTE L'I-STAT NELLA VALUTAZIONE DELLA INSUFFICIENZA RESPIRATORIA ACUTA: NOSTRA ESPERIENZA

R. Lovero¹, M. Leone², P. Ciola¹, A. Carucci¹, E. Vinci¹

¹Sez. Lab. di Chimica Clinica, Osp. Fasano, AUSL Brindisi

²U.O. Emergenza Territoriale 118, AUSL Brindisi

L'emogasanalisi (EGA) permette di dosare nel sangue arterioso e venoso alcuni analiti necessari per la valutazione dell'equilibrio acido-basico ed elettrolitico, dell'adeguatezza della ventilazione alveolare e dello stato di ossigenazione del paziente. L'I-STAT è un analizzatore portatile in grado di eseguire l'EGA con un tempo di refertazione pari a 120 secondi.

Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare l'utilità del I-STAT, in dotazione alla postazione medicalizzata 118 di Ostuni della AUSL Brindisi, come supporto diagnostico nella valutazione clinica dei pazienti con insufficienza respiratoria acuta (IRA).

Materiali e metodi. Per questo studio sono stati reclutati n.22 (10 F e 12 M) soggetti che non presentavano segni clinici di IRA, e n.40 (18 F e 22 M) pazienti che mostravano segni clinici di IRA (14 M con EPA, 8 M con BPCO riacutizzata, 10 F con EPA e 8 F con BPCO riacutizzata). Su tali soggetti è stato eseguito il dosaggio dell'EGA sia con l'analizzatore I-Stat durante il trasporto in ospedale sia, successivamente, con Ciba Corning Corp 800 Series presso il P.O. di Ostuni. Analisi statistica: t-test per il confronto delle medie.

Risultati. I valori di pH, PCO₂, PO₂ ottenuti con l'I-Stat sono stati successivamente confermati sull'analizzatore Ciba Corning Corp 800 Series, sia nei soggetti con IRA che in quelli senza IRA.

Conclusioni. Alla luce di quanto esposto, in considerazione dei dati da noi ottenuti, è possibile affermare che l'utilizzo dell'I-Stat in ambulanza può aiutare il medico del 118 a discriminare in maniera più tempestiva tra BPCO e EPA al fine mettere in atto una più idonea terapia per migliorare il decorso clinico dell'IRA.

Bibliografia

Siafkas NM, Vermiere P, Pride NB, et al., "Optimal assesment and Management of COPD", Consensus Statement. Eur Resp J 1995;8:1398-1420.

006

ASSISTENZA TERRITORIALE: DIAGNOSTICA DECENTRATA E TELEMEDICINA

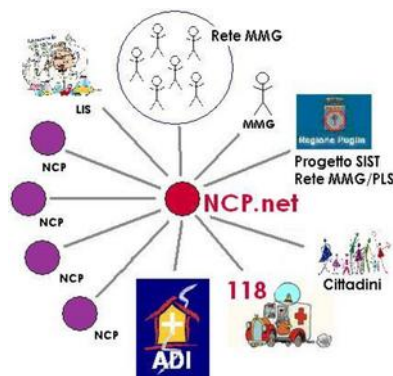
A. Matarrese¹, R. Lovero¹, A. Carucci¹, S. Tundo¹, E. Vinci¹

¹Sez. Lab. di Chimica Clinica, Osp. Fasano, Ostuni, AUSL Brindisi

L'obiettivo del SSN è soddisfare l'aumento e il cambiamento dei bisogni di salute ed assistenziali del cittadino con le limitate risorse finanziarie. L'innovazione delle bio-tecnologie e dell'informatica hanno permesso "il trasporto" telematico dei dati, avviando una profonda destrutturazione del sistema sanitario (Telemedicina). L'Azienda U.S.L. BR/1 si è posta l'obiettivo di potenziare l'offerta assistenziale del territorio: migliorando il servizio ai cittadini e svolgendo una funzione di filtro verso le strutture di II° livello. Le modalità per raggiungere l'obiettivo sono: favorire le condizioni per la nascita di forme aggregate ed integrate di Assistenza Primaria e Continuità Assistenziale 24 ore al giorno; favorire l'associazionismo fra Medici; monitorare le patologie croniche applicando i protocolli regionali; potenziare l'Assistenza Domiciliare Integrata. Il Progetto NCP.net prende in considerazione 25 SIATA (Servizio Integrato di Assistenza Territoriale Ambulatoriale) distribuiti equamente nella provincia di Brindisi a cui faranno riferimento sia i Medici di Medicina Generale, sia i Pediatri di Libera Scelta sia il Servizio di Emergenza Territoriale 118. La dotazione tecnologica di ciascuna SIATA sarà così allestita: n°1 Elettrocardiografo; n°1 P.O.C.T.; n°1 Ecografo portatile. La peculiarità del progetto sta nel fatto che tutti i sistemi diagnostici sono informaticamente integrati in rete per attività di second opinion (Elettrocardiografia ed Ecografia) e validazione analitica remota (POCT). NCP.net gestisce in modo unitario tutti i referti ed i dati clinici del cittadino residente nella provincia di Brindisi (Fascicolo Sanitario Personale).

Bibliografia

Dietro il computer ci deve essere Ippocrate, Cosmacini G., Telema n.9, 1997



007

IMPLEMENTAZIONE DI UN SISTEMA GESTIONALE ESPERTO NEL SETTORE DI EMATOLOGIA

L. Zorzino¹, M. Picozzi¹, M. Sesia¹, A. Lomonaco¹, M. T. Sandri¹

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

Introduzione. L'esigenza si riorganizzare e migliorare il servizio offerto dal laboratorio nell'ambito del settore dell'ematologia nasce dalla necessità di eseguire diagnosi veloci e complete in prima battuta ed effettuare una gestione del campione ematologico articolata e completa. **Scopo.** Il nostro scopo è stato quello di valutare l'impatto dell'introduzione di un sistema gestionale automatizzato sull'efficienza del settore di ematologia all'interno di un laboratorio analisi di una struttura oncologica.

Metodi. Nel gennaio 2007 abbiamo implementato il gestionale CD-LAB (Omnilab), integrato all'analizzatore Cell-Dyn Sapphire (Abbott). Questo sistema è in grado di supportare tutto il processo dell'analisi ematologica in laboratorio, dalla fase pre- a quella post-analitica, inoltre consente il collegamento al LIS tramite il sistema LAB-ONLINE, la gestione centralizzata del QC, la validazione automatica centralizzata dei risultati in base a regole decisionali stabilite dal laboratorio e l'archiviazione di informazioni numeriche, grafiche e morfologiche, comprensive delle immagini microscopiche.

Risultati. In base alle regole che tengono conto dei dati anagrafici, delta-check, dati numerici, flag morfologiche ed allarmi strumentali, i campioni sono stati validati automaticamente o inviati alla validazione manuale col suggerimento di azioni riflesse (controllo con diversa modalità analitica, striscio del vetrino...), permettendo ai campioni "normali" di essere refertati immediatamente ed automaticamente. Mediamente pervengono al nostro laboratorio 230 emocromi al giorno, di cui il 42% richiesto in modalità urgente. Grazie al sistema gestionale esperto abbiamo valutato che l'80% delle richieste non ha violato le regole impostate, il 9% ha richiesto una revisione microscopica ed il restante 11% è stato ripetuto con una diversa modalità analitica.

Conclusioni. Il sistema di validazione ha permesso di focalizzare l'attenzione degli operatori solo sui casi che hanno richiesto particolari valutazioni, rendendo visibili ai clinici, in tempo reale, i risultati dei campioni "normali", consentendo un risparmio di risorse e una standardizzazione dei comportamenti decisionali, oltre al miglioramento della qualità del servizio offerto dal laboratorio.

008

MATRICE DELLE COMPETENZE IN LABORATORIO E VALUTAZIONE DEL POSSESSO DEI REQUISITI: LA NOSTRA PROPOSTA

C. Martini¹, S. Secondini¹, M. Gubinelli¹, F. Pecci¹, F. Piersantelli¹, A. Priori¹, E. Renzi¹, P. Pauri¹

¹U.O. Patologia Clinica, Ospedale di Jesi (AN), ASUR Marche Zona territoriale 5

L'idea di elaborare una matrice delle competenze è scaturita dalla raccomandazione fattaci dall'Ente di Certificazione RINA di migliorare la verifica dell'efficacia della formazione attuata, dall'enfasi che la norma ISO 15189:2003 pone sui requisiti del personale, nonché dall'analisi degli standard di accreditamento relativi ai laboratori, delineati dalla Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations, che includono la valutazione delle competenze delle risorse umane.

Il nostro progetto si è sviluppato da due principali documenti:

- 1) la guida del gruppo di lavoro della European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine EC4. (Clin Chem Lab Med 2005)
- 2) la matrice delle competenze applicabile a qualsiasi processo, suggerita da "ReQuS, una Rete per la Qualità della Scuola" progetto del M.I.U.R. (2004).

La guida EC4 individua sei aree di competenza richieste, in un'ottica di eccellenza, agli specialisti in medicina di laboratorio: clinical, scientific, technical, communication, management-leadership, professional autonomy-accountability. L'EC4 invita le società scientifiche nazionali ad adattare alla propria realtà la definizione delle competenze, in modo che siano comunque equivalenti all'interno dell'EU.

Il documento "ReQuS" focalizza invece l'attenzione sul concetto di competenza, intesa come capacità di applicare conoscenze, adottando comportamenti funzionali al raggiungimento del livello richiesto.

La matrice che proponiamo, inserita in una scheda di valutazione professionale annuale, considera per il 70% le competenze (risultanti da indicatori di conoscenze, capacità, comportamento) e per il 30% gli indicatori di miglioramento.

La scheda, elaborata mediante foglio excel e compilata in ambito del riesame della direzione e poi dal Direttore di U.O. individualmente con ciascun operatore, permette di calcolare l'indice di valutazione professionale individuale, attraverso gli scostamenti tra livello ottenuto e livello desiderato di ciascun indicatore.

Tale scheda potrebbe essere uno strumento utile per sviluppare ed orientare le capacità professionali, per valutare il raggiungimento degli indicatori e per seguire l'andamento della formazione, in un'ottica di miglioramento continuo.

009

L'INDICE LIPEMICO (IL) SU ANALIZZATORE MODULAR ROCHE NON RAPPRESENTA UNA STIMA AFFIDABILE DELLA LIPEMIA DEL CAMPIONE PLASMATICO

C. Valente¹, R. Dominici¹, M. Panteghini¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera L. Sacco, e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano

Scopo. La torbidità dei campioni plasmatici da iperlipemia è solitamente rilevabile con trigliceridemia (TG) >300 mg/dL e può rappresentare un importante fattore di interferenza nelle misure analitiche. Per rilevarne la presenza, il laboratorio dovrebbe adottare sistemi oggettivi e standardizzati di valutazione al fine di gestire in maniera idonea il problema dell'eventuale interferenza analitica (1). L'utilizzo dei cosiddetti "indici", da valutarsi in completo automatismo sui campioni analizzati, rappresenta la soluzione idonea per documentare la presenza e l'entità del possibile interferente. Nell'intento di una possibile applicazione della misura dell'IL nella nostra operatività ordinaria, che utilizza l'analizzatore Roche Modular P, abbiamo valutato in via sperimentale quanto l'IL misurato da questo strumento sia una stima attendibile della TG.

Metodi. E' stata prima valutata la correlazione tra IL e TG su 28.270 campioni. Successivamente, tenendo conto che la metodica più sensibile alla torbidità (bilirubina totale) presenta un'interferenza per IL >75, è stata stimata la frequenza di tali IL su altri 53.900 campioni consecutivi, sui quali è stata anche valutata la frequenza di TG >300 mg/dL (soglia per la torbidità da iperlipemia). In considerazione della possibile introduzione della misura diretta del LDL colesterolo, abbiamo infine valutato quanto il limite di IL suggerito dal produttore (200) corrispondesse alla concentrazione interferente di TG (1200 mg/dL) per lo stesso metodo.

Risultati. La correlazione tra IL e TG evidenziava una buona dipendenza della stima dell'IL dalla TG ($r^2=0,47$). Tuttavia, nel secondo esperimento i campioni con IL >75 erano lo 0,3%, mentre quelli con TG >300 erano 5,9%, con un'evidente non corrispondenza nella frequenza dei due limiti minimi di interferenza. La scarsa corrispondenza tra IL e TG era confermata su 40 campioni con TG >1200 mg/dL (intervallo: 1209-4912) dei quali solo 14 (35%) mostravano IL >200 ($r^2=0,23$).

Conclusioni. La stima di IL su analizzatore Modular non è sufficientemente accurata per poter essere applicata alla rilevazione dell'eventuale non idoneità dei campioni biologici e, quindi, se ne sconsiglia l'uso nella pratica quotidiana.

Bibliografia

1. Lippi G, et al. *Biochim Clin* 2007;31:216.

010

AMINO ACID DETERMINATION IN BIOLOGICAL FLUIDS BY AUTOMATED PRE-COLUMN DERIVATIZATION: IMPROVEMENT OF THE o-PHTHALALDEHYDE METHOD

E. Riotto¹, V. Rizzo¹, E. Scoglio², R. Moratti¹

¹Dip. Biochimica, Sez. Analisi Chimico-cliniche, Policlinico S. Matteo, Pavia

²EsseCi Group, Villa Guardia, Como

Background. The derivatization of amino acids (AAs) using o-phthalaldehyde (OPA) is the most frequently applied reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the quantitative determination of primary amino acids in biological fluids. However, the relative instability of the OPA adducts limits the reproducibility and the proper quantification of this method. The HT400E is a newly available equipment for AAs analysis that allows automatic on-line mixing all reagents for OPA derivatization. This optimized procedure allows optimal derivatization conditions (1), programming flexibility, microsample capacity and considerably higher sample evaluation.

Methods and Results. Deproteinized plasma, urine and cerebrospinal fluid were derivatized with OPA/ β -ME (mercaptoethanol) and analyzed by a RP-HPLC/HT400E system. A high speed gradient separation was developed for the analysis of mixtures of 24 AAs in approximately 40 min. Optimized combinations of β -ME with OPA (0.33 μ l/mg OPA), reaction time (1 min) and of the solvent used (dilution of the samples with borate buffer) resulted in a within-run precision <1.56%, except for the lowest concentration of GABA (3.16%), Orn (8.8%), Lys (7.34%) and Asp (4.46%). Between-run precision was <6.6%, except for GABA, Trp, Orn, Lys (10.2%). The detection was still linear at 0.4 μ mol, except for Orn (2.97 μ mol). The upper limit was at least 680 μ mol. The recovery studies were satisfactory (nearly 100%) and showed that AAs peaks were correctly identified. OPA-AAs concentration in biological fluids was in the expected physiological range, similar (and correlated) to those obtained by a conventional aminoacid-analyzer.

Conclusions. The RP-HPLC/HT400E system for detection of OPA-AAs in biological fluids provides high accuracy and sensitivity and represents an alternative to ion-exchange chromatography.

References

1. Dorresteyn RC, et al. *J. Chromat A* 1996;724:159-67

011

MODELLO STATISTICO QUALE SUPPORTO DELL'INDAGINE STRUMENTALE NELLA VALUTAZIONE D'INFEZIONE URINARIA

F. Cerroni¹, F. Mancinelli², P. Cipriani³, R. Barbanti⁴, D. De Prosperis⁵, P. Cardelli¹

¹Dip. di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università "Sapienza" Roma

²U.O.C. Diagnostica di Laboratorio Osp. S. Andrea, Roma

³Dip. di Sanità Pubblica Università "Sapienza", Roma

⁴Osp. S. Andrea, Roma

⁵Università "Sapienza", Roma

⁶Dip. di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università "Sapienza", Roma

Scopo del lavoro. Le strumentazioni automatiche impiegate nell'indagine del sedimento urinario ci hanno indotto ad una valutazione al fine di un loro impiego nel campo delle infezioni urinarie.

Materiali e metodi. L'indagine è stata eseguita attraverso l'impiego di due strumentazioni automatiche: Sysmex UF-100 (Dasit) con tecnologia basata su metodo citofluorimetrico ed IRIS IQ 200 (IL) con tecnologia basata su microscopia computerizzata del sedimento urinario.

Gli elementi di interesse microbiologico che sono stati presi in esame sono stati: leucociti e batteri per l'UF-100, e leucociti, batteri ed elementi di piccole dimensioni per l'IRIS IQ200. L'indagine è stata condotta su 392 campioni di urine che sono state sottoposte sia ad esame colturale che ad esame strumentale.

Risultati. I risultati dell'indagine sui 392 campioni di urine sono stati per l'UF-100:

350 concordanti (312 veri negativi, 38 veri positivi) con l'esito microbiologico

42 non concordanti (12 positivi per UF-100 e negativi per l'esame colturale; 30 negativi per UF-100 e positivi all'esame colturale)

Per l'IRIS IQ-200:

369 concordanti (316 veri negativi, 53 veri positivi) con l'esito microbiologico

23 non concordanti (8 positivi per IRIS IQ 200 e negativi per l'esame colturale; 15 negativi per IRIS IQ 200 e positivi all'esame colturale).

Conclusioni. L'analisi statistica utilizzando il software di elaborazione dati "Data Mining", applicata ai risultati ottenuti, ci ha consentito di creare dei diagrammi decisionali per definire i cut-off strumentali delle variabili di interesse. La valutazione dei dati preliminari è incoraggiante pur tuttavia sarà necessario ampliare la casistica per ipotizzare una possibile validazione del modello proposto.

Bibliografia

1. Ian H. Witten, Eibe Frank "Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques(Second Editin)" June 2005.

012

MESSA A PUNTO DI UNA METODO PER VERIFICARE ALLINEAMENTO E BIAS TRA DUE LINEE ANALITICHE MEDIANTE I RISULTATI PRESENTI SUL LIS ED OTTENUTI IN ROUTINE

G. Miceli¹, A. Pracucci¹, D. Imolesi Casadei¹, S. Mengozzi¹, M. Della Strada¹, P. Iorio¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Azienda USL Cesena

Background e rationale. La razionalizzazione nella operatività del nostro Lab. ha portato alla creazione di 2 percorsi analitici di chimica clinica paralleli. In una linea vengono analizzati circa 400 campioni/die. Tale linea attiva H24 è dedicata ad analisi urgenti ed analisi routinarie (solo su pazienti ricoverati). L'altra linea analizza circa 900 campioni/die ed è dedicata ad analisi eseguite su soggetti non ricoverati. I due processi utilizzano sistemi di due fornitori diversi per motivi di gestibilità economica. L'allineamento tra i due sistemi è stato verificato prima della messa in operatività del sistema con carico di lavoro maggiore. L'altro è stato assunto come sistema di riferimento in base ad esigenze organizzative locali. Successivamente abbiamo messo a punto una modalità operativa per verificarne l'allineamento ed il bias mediante l'impegno di campioni analizzati routinariamente.

Materiali e metodi. Un sistema di query create mediante Microsoft Access è stato sviluppato per utilizzare i dati prodotti in analisi di routine per elaborazione statistica e visualizzazione grafica in Microsoft Excel. Le tabelle del LIS (Openlis) usate nelle query sono tabelle Oracle. L'elaborazione statistica (valutazione del coefficiente di correlazione e applicazione del metodo di Bland ed Altman) e la visualizzazione grafica hanno permesso la valutazione di correlazione e bias tra un sistema Modular SWA Roche ed un sistema Ci8200 Abbott. Ognuna delle 2 linee viene sottoposta a controllo di precisione ed accuratezza indipendentemente mediante procedure di controllo di qualità interno, interno allargato ed esterno sottoposte a verifica e certificazione di qualità esterna.

Risultati. E' stato possibile: a) monitorare la correlazione con dati analitici prodotti nelle reali condizioni di utilizzo b) impostare alcuni fattori di correzione nei casi di evidenza di bias non imputabili a disfunzioni dei sistemi analitici.

Conclusioni. L'esperienza di sviluppo ci ha permesso di evidenziare come attraverso alcune semplici integrazioni con software di comune utilizzo sia possibile supplire alle carenze strutturali presentate dai LIS a livello di supporto di funzioni quali la correlazione tra due sistemi analitici.

Bibliografia

1. Bland et al. Lancet 1:307-10,1986

013

WORKFLOW RESULTS OF WORKCELL AUTOMATION SYSTEMS IN A LARGE LABORATORY

L. Caberlotto¹, L. Martini¹, A. Agostini¹, G. Andreuzza¹, G. Benetton¹, F. Cuzzolin¹, B. Giusto¹, B. Levorato¹, M. Meneghel¹, R. Steffani¹, P. Tiveron¹, S. Velo¹

¹Lab. Chimica Clinica, Azienda ULSS 9, Treviso

Background. Any laboratory can gain benefit from automation, with available options ranging from workcells to fully automated systems. The optimal level depends on laboratory setting as well as on cost, throughput, and flexibility of automation. Evaluating field performances of different solutions may support the choice.

Methods. Automation for routine testing of clinical chemistry and immunochemistry included a pre-analytical workcell with centrifuge (FE500, Tecan), a workcell for chemistry (with no.2 Aeroset, Abbott Diagnostics) and an integrated workcell for chemistry and immunochemistry (with no.2 Architect ci8200 and no.1 Axsym, Abbott Diagnostics). Just one blood sample for patient request was needed for 54 tests. The study evaluated sample workflow, by analysis of data tracked in laboratory information system. The evaluation considered 86 working days over 6 months during year 2006, with 87,877 samples and 921,639 tests (20.5% and 24.7% of year workload); data were analysed about timing of laboratory process, from sample checking to result validation.

Results. The mean time of daily means between pre-analytical sample input and final clinical validation of single result was 119 minutes (SD 31, lower value 68, higher value 235 minutes). The mean times observed for pre-analytical phase, for analysis and for post-analytical validation were respectively 42, 49 and 28 minutes. Total workload was completed by 95% at 12:08 for pre-analytical input and at 13:06 for input on analysers. Technical validation was completed by 95% of daily workload at 14:03; clinical validation, followed by electronic reporting, involved 95% of tests at 14:34.

Conclusions. The study demonstrates that result turnaround time was acceptable for clinical needs, in spite of a significant workload and the absence of fully integrated systems. Thus, balance between laboratory functionality and throughput may be achieved by less extensive automation solutions, linked to information systems focused on data control. This integration, correctly customised, makes efficiency comparable to more demanding solutions.

Bibliography

1. Hubl W et al. Evaluation of analytical methods and workflow performance of the Architect ci8200 integrated serum/plasma analyser system. Clin Chim Acta 2005;357:43-54

014

G6PD-RIGNANO: A NOVEL MISSENSE MUTATION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (G6PDH) GENE ASSOCIATED WITH ASYMPTOMATIC HIGH ENZYME DEFICIENCY

A. Minucci¹, P. Concolino¹, C. Zuppi¹, B. Giardina¹, E. Capoluongo¹

¹Dipartimento di Biochimica Clinica Policlinico Universitario A. Gemelli

Background. The principal clinical signs of G6PDH deficiency are acute hemolytic anemia and jaundice induced by infection or ingestion of oxidative drugs and/or broad beans. In Italy, the most common variant associated with favism is that Mediterranean one.

Methods. A 21-year old man, without history of favism or episodes of haemolysis was addressed to our Laboratory for a general screening finalised to the admission at Police School. All the laboratory biochemical tests resulted within the normal ranges, with the exception of total bilirubinemia (1.3 mg/dl), direct bilirubinemia (0.5 mg/dl) and G6PDH activity (41,9 UI/Red blood cells; 1.46 UI/Hb). The red blood count (RBC) gave the following results: total RBC = 5.26 million/uL and Hemoglobin = 15.9 g/dL. On the basis of these results, we suggested him the execution of the G6PDH genetic test. Therefore, we performed a preliminary genetic screening including only the most frequent G6PDH mutation affecting the Italian population (eight mutations). Since the latter resulted mute, we decided to sequence the entire G6PD gene.

Results. All the exons and intron-exon junctions resulted wild type, with the exception for exon3 presenting the G130A (Ala44Thr). This missense mutation was in proximity of the coenzyme binding domain of the enzyme. In particular it regards the last aminoacid of fingerprint GxxGDLx of coenzyme binding domain (residues 38-44). The same result was obtained on the 45 years old mother which resulted G130A heterozygous. Also the mother presented impaired G6PD activity (117 UI/Red blood cells; 3.7 UI/Hb). The RBC and the haemoglobin values 4.7 million/uL and 15.0 g/dL, respectively, without reticulocytosis.

Conclusions. In the present paper we report a case of asymptomatic patient with high in vitro G6PD deficiency carrying a novel inherited mutation at position G130A (Ala44Thr) which we decided to define as "G6PD RIGNANO variant", considering that the country where the patient was born is a small town named Rignano Flaminio (Lazio, Italy).

Further studies needs to better understand the prevalence of this novel mutation in this Italian area and the possible mechanisms of compensation resulting in an apparent producing absence of haemolysis.

015

G6PD-CASSANO: UNA MUTAZIONE PUNTIFORME DELLA GLUCOSIO-6-FOSFATO DEIDROGENASI CARATTERIZZATA DA GRAVE CARENZA ENZIMATICA NON ACCOMPAGNATA DA MANIFESTAZIONI CLINICHE

A. Minucci¹, P. Concolino¹, C. Zuppi¹, M. Antenucci¹, B. Giardina¹, E. Capoluongo¹

¹Dipartimento di Biochimica Clinica Policlinico Universitario A. Gemelli

Introduzione. Il deficit di G6PD o favismo è una condizione determinata dalla carenza dell'enzima G6PD, importante in una via metabolica minore del glucosio. Il deficit di G6PD è definito una condizione farmacogenetica: i sintomi della malattia si manifestano, nella maggioranza delle persone affette, solo in seguito all'esposizione a fattori scatenanti, quali ingestione di fave, ma anche digiuno, infezioni, somministrazione di alcuni farmaci (aspirina, sulfamidici).

Metodi. Riportiamo il caso di un ragazzo di 23 anni di Caserta presentatosi al nostro ospedale per ripetere il dosaggio enzimatico della G6PD dopo aver scoperto per caso di esserne seriamente carente. Da noi interrogato riferisce di aver sempre mangiato le fave, di coltivarle, e di aver assunto quei farmaci a rischio per chi è affetto da favismo.

Risultati. Il dosaggio enzimatico della G6PD si è confermato patologico (<1% dell'attività): Attività enzimatica: 15 UI/L, rapporto attività enzimatica/GR: 3.0 (220-570) rapporto attività enzimatica/Hb: 0.1 (7-20). Gli altri test biochimici di laboratorio eseguiti sul paziente sono risultati tutti negativi. Su nostro consiglio si è sottoposto a test genetico per evidenziare una eventuale mutazione del gene della G6PD. Risultato wild-type per le mutazioni considerate più frequenti in questa zona dell'Italia abbiamo deciso di sequenziare l'intero gene. Questa analisi ha permesso di evidenziare una mutazione puntiforme nell'esone 11, 1347g/c (Gln449His) e il polimorfismo silente sempre nell'esone 11, 1311c/t (Tyr437Tyr). Questa mutazione è nota come G6PD-CASSANO.

Conclusioni. La mutazione G6PD-Cassano è stata trovata per la prima volta nel 1993 in Calabria ed è considerata una mutazione rara per l'Italia.

La mancanza di ascendenti di origine Calabrese da parte del soggetto in esame, unitamente all'assenza di sintomatologia, potrebbe far pensare che questa mutazione possa essere molto più frequente in Italia di quanto fino ad oggi riportato e quindi non unicamente confinata alla regione di origine.

016

GENETIC HETEROGENEITY OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENCY REVEALED BY RFLP AND SEQUENCE ANALYSIS

A. Minucci¹, P. Concolino¹, C. Santonocito¹, S. Rocchetti¹, C. Zuppi¹, M. Antenucci¹, B. Giardina¹, E. Capoluongo¹

¹Dipartimento di Biochimica Clinica Policlinico Universitario A. Gemelli

Background. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency is an X-linked disorder characterized by broad genetic and biochemical heterogeneity. Over 440 genetic variants have been classified into five classes based on the residual enzymatic activity and clinical manifestations. The molecular bases of almost all polymorphic Italian variants have been identified.

Methods. We examined 60 G6PD-deficient subjects (31 males) occurring to our laboratory for G6PD activity determination. Genomic DNA was obtained using standard techniques (High Pure PCR Template Preparation Kit-Roche). All samples were investigated by the PCR techniques and enzyme digestion specific for the most common variants in our geographical area: C563T (Mediterranean), G202A (A-), G844C (Seattle) and G854A (Montalbano). If this screening test resulted negative, we sequenced the entire G6PD gene.

Results. PCR amplification followed by restriction analysis identified four G6PD variants. The commonest variant was G6PD Mediterranean (67%), followed by G6PD Seattle (8.3%), G6PD A- (5%) and G6PD Cassano (3%); also only two case of G6PD Chatam were are found. Also a novel genetic mutation (G130A) in the third exon was found in an asymptomatic young subject living in Lazio. We named this novel mutation the "G6PD RIGNANO variant".

These results confirm the genetic heterogeneity of G6PD gene reported in other studies and the high frequency of the G6PD Mediterranean mutation in Italy. The allelic frequency for G6PD Seattle resulted to be more high.

Finally, the Cassano variant seems to be more frequent in our region. The data may be to the fact that the Cassano mutation gives an asymptomatic phenotype, thus despite of very low G6PD activity in vitro.

Conclusions. The complex historical background of the geographic area analysed here has probably played an important role in creating such a genetic admixture. Further investigation to be necessary for biochemical characterization of the G6PD-Cassano mutation.

Reference

1. Alfinito F., et al. Molecular characterization of G6PD deficiency in Southern Italy: heterogeneity, correlation genotype-phenotype and description of a new variant (G6PD Neapolis). *Br J Haematol.* 1997 Jul;98(1):41-6.

017

STUDIO DELLA METILAZIONE DEL PROMOTORE DI EMP3 IN OLIGODENDROGLIOMI DI GRADO II

A. Pracucci³, A. Pasini¹, D. Imolesi Casadei³, E. Giordano⁴, S. Cavalcanti¹, S. Cerasoli², G. Guiducci², M. Faedi², A. Cremonini², M. Dall'Agata², N. Cimini², P. Iorio³

¹Lab. di Ingegneria Cellulare e Molecolare II Facoltà di Ingegneria; Università di Bologna, Campus di Cesena

²Gruppo Neuro-oncologico Romagnolo, AUSL Cesena

³Lab. Analisi AUSL Cesena

⁴Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" Università di Bologna

La perdita di eterozigotità (LOH) 1p/19q è un indicatore prognostico positivo in corso di oligodendroglioma (ODG) anaplastico. La regione più frequentemente deleta (19q13) comprende il gene potenzialmente oncosoppressore EMP3 (Epithelial Membrane Protein 3 - 19q13.3), di cui è stato recentemente dimostrato il silenziamento epigenetico in tumori del sistema nervoso centrale [Alaminos 2005]. Questo silenziamento potrebbe avere un significato prognostico critico in caso di concomitante perdita di uno degli alleli.

In questo studio abbiamo valutato la relazione tra LOH 1p/19q e l'ipermetilazione del promotore del gene EMP3 in un gruppo di 24 pazienti con ODG di II grado. Negli stessi campioni è stata inoltre studiata la metilazione di MGMT (O6 Methylguanine DNA Methyltransferase - 10q26) che ha un ben noto valore prognostico positivo nei gliomi ad alto grado e della quale è in corso di indagine il significato in forme tumorali meno aggressive. Come termine di riferimento, la metilazione promotoriale è stata anche valutata in un gruppo di 17 campioni di glioblastoma multiforme (GBL).

Per rivelare la LOH è stato utilizzato il metodo di amplificazione dei satelliti. In particolare sono stati impiegati i markers D19S408, D19S867 e D19S926 per il cromosoma 1p, e D1S468, D1S2736, D1S514 e D1S224 per il cromosoma 19q. Per la valutazione dello stato di metilazione è stata impiegata la Methylation Specific PCR (MSP).

In 7/24 ODG è stata evidenziata la perdita completa del braccio 19q. Negli stessi 24 pazienti è stata riscontrata metilazione in 22 casi per il promotore EMP3 e in 18 casi per MGMT. Nei GBL le proporzioni diventano rispettivamente 3/17 EMP3 e 5/17 MGMT.

L'elevata prevalenza della metilazione del promotore di EMP3 – che ha luogo in assenza e in presenza di LOH 19q – suggerisce che essa faccia parte di un profilo epigenetico costitutivo degli ODG di grado II. Per trarre indicazioni epidemiologiche rilevanti sarà necessario ampliare la casistica e seguire l'evoluzione clinica dei pazienti arruolati nello studio.

Bibliografia

1. Alaminos M et al. Cancer Res. 2005(65)7:2565.

018

BIRT-HOGG-DUBÉ (BHD) SYNDROME: REPORT OF TWO NOVEL GERMLINE MUTATION OF THE FOLLICULIN (FLCN) GENE

A. Spila¹, R. Palmirotta¹, A. Savonarola¹, G. Ludovici¹, L. Polce¹, B. Leone¹, M. Ciancia¹, I. Lucci¹, S. D'Angelo¹, P. Ferroni¹, P. Donati², F. Guadagni¹

¹Department of Laboratory Medicine & Advanced Biotechnologies, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy

²Unit of Skin Histopathology, IRCCS San Gallicano Dermatologic Institute, Rome, Italy

The Birt-Hogg-Dubé syndrome (BHD) is a rare inherited autosomal genodermatosis predisposing patients to develop hair follicle hamartomas, pneumothorax, and increased risk for renal cancer. The syndrome is caused by several germline mutations in the folliculin (FLCN) gene, the most frequent occurring within a C8 tract of exon 11. This hypermutability is probably due to a "slippage" in the DNA polymerase during DNA replication, resulting in gains or losses of repeat units as it happens for other genes causing cancer predisposition.

In this study, one three generation BHD kindred with 4 affected subjects (Family A) and one two generation kindred with 4 affected subjects (Family B) were studied. Genetic counseling was performed and family trees were obtained for both families. Written informed consent was obtained from each participating patient. Molecular analysis of the FLCN gene was performed on genomic DNA obtained from at least two independently drawn whole blood samples. The coding sequence and intron-exon borders of all 14 exons of FLCN were amplified and analyzed using SSCP analysis followed by sequencing. Molecular analysis showed the occurrence of two frameshift mutations, not previously reported: 1345delAAAG in exon 9 that introduces a premature stop 24 aminoacids downstream at codon 321, in Family A members and 802insA in exon 5 that introduces a premature stop 16 aminoacids downstream at codon 132, in Family B members. Of interest, exon 9 mutation was associated to gastrointestinal, breast and parotid cancer in Family A, whereas exon 5 mutation of Family B was associated only with clinical evidence of dermatological lesions. A novel sequence variant in the intron 9 (IVS9 +5C>T) was also found in Family B proband. Based on present results and on literature data, we may therefore conclude that the occurrence of BHD germline mutations different from the more common hotspot in the exon 11, mainly exon 9 mutations, might be responsible for different pathogenetic mechanism(s), possibly involved in cancer predisposition for BHD kindreds.

References

- Nickerson ML, et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Cancer Cell* 2002;2:157-64.

019

NO-DONOR TREATMENT REDUCES NEO-INTIMAL FORMATION AND MODULATES BIOCHEMICAL EFFECTORS IN AN EX-VIVO HUMAN MODEL OF INTIMAL HYPERPLASIA

C. Colotti¹, M. Maltinti¹, V. Angeli¹, V. Ottaviani¹, S. Vittorini¹, S. Del Ry¹, A. Paolicchi¹, D. Giannessi¹

¹CNR, Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy

Purpose. The use of Drug-eluting stents (DES), that reduces the incidence of restenosis after PTCA, is associated to higher risk of late thrombosis and myocardial infarction. These events seem to be due to a delayed reendothelialization process. Aim of this study was to evaluate the pathophysiology of intimal hyperplasia (IH), the main cause of restenosis after stent implantation, and the feasibility of pharmacological manipulations in an ex vivo human model of IH.

Methods. Saphenous vein segments (n=10) were subdivided in various fragments: 1. stored at -80°C (baseline); 2. and 3. cultured for 10 days in RPMI-1640 alone (control) or supplemented with 30% (v/v) FCS (culture), respectively and 4. cultured with DETANONOate, an NO donor (100 μM). Interleukin (IL)-6, osteopontin (OPN), matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9, caspase (CASP)-3 and -9 and their inhibitors were determined by Western Blotting, immunometric assays and RT-PCR.

Results. Intima thickness increased in culture and was associated with an enhanced release of OPN, IL-6 and MMPs in the culture media (OPN: 13.9±2.9 vs 2.3±0.8 μg/ml, p=0.0011; IL-6: 304.2±64.7 vs 42.0±10.1 ng/ml, p<0.0006; MMP-2: 173.7±30.0 vs 111.9±26.9 ng/ml; MMP-9: 3.8±0.9 vs 2.3±0.6 ng/ml, for culture and control, mean±SEM). Similar results were found in tissue (OPN: 82.0±30.3; 13.8±4.2; 3.7±0.7 ng/mg protein in culture, control and baseline, p=0.0051, p=0.018, respectively; IL-6: 4.2±0.10 vs 0.97±0.30 ng/mg protein, culture vs control, p=0.002; undetectable at baseline). OPN, MMP and CASP mRNA levels were higher in culture than at baseline and in control (CASP inhibitor systems were modified accordingly). DETANONOate reduces IH progression of 25% and modulates biochemical marker expression (OPN/GAPDH: undetectable baseline; 0.27±0.06 control; 0.89±0.28 culture; 0.09±0.05 NO; culture vs baseline, p=0.026; vs control, p=0.018; vs NO, p=0.005).

Conclusions. The enhanced OPN, IL-6, MMP and CASP production, associated to lumen reduction, confirms their crucial role in IH. DETANONOate treatment resulted effective in the reduction of IH and alteration of biochemical processes also in human vessels suggesting possible development of new anti-IH therapies suitable for DES covering.

020

MITOCHONDRIAL DNA 4977bp DELETION AND RESPIRATORY CHAIN DYSFUNCTION IN CORONARY ARTERY DISEASE

C. Federici¹, M. G. Andreassi¹, N. Botto¹, I. Bellino⁴, V. Lucchetti⁴, G. D. Angelini³, E. Picano²

¹Lab. Biologia Molecolare e Genetica, IFC-CNR, Osp. Pasquinucci, Massa, Italy

²CNR, Istituto di Fisiologia Clinica, Pisa, Italy

³Bristol Heart Institute, University of Bristol, Bristol Royal Infirmary, Bristol, United Kingdom

⁴Cardiology Clinic Montevergine, Mercogliano, Italy

Background. Mitochondrial DNA (mtDNA) and respiratory function decline have been proposed as important contributors to atherogenesis. Therefore we investigate the frequency of the 4977 mitochondrial DNA bp deletion (common deletion or mtDNA4977) and the mitochondrial chain enzyme activities in patients with and without coronary artery disease (CAD).

Methods. Mitochondrial DNA deletion was detected by using a PCR co-amplification reaction of mtDNA4977 in biopsies of atrial tissue from 22 patients (11 male, 66.2±8.1 years) undergoing coronary artery (n=11) and valve surgery (n=11). Respiratory complex I-IV, and citrate synthase activities were spectrophotometrically assessed.

Results. The frequency of occurrence of the mtDNA4977 was 67.0% and 100% for patients without and with CAD, respectively ($\chi^2=2.7$, p=0.05). The relative amount of mtDNA4977 was significantly higher in atrial tissue of patients with CAD (0.2±0.05 vs 0.14±0.08, p=0.03). Specific activity levels of complex III was significantly lower in CAD patient when compared to no-CAD patients (2.8±0.5 vs 4.0±1.2 μmol/min/mg protein, p=0.006).

Conclusions. These observations support the hypothesis that mtDNA damage and impaired respiratory chain function may represent an additional major genetic factor in the pathogenesis of CAD and its complications.

021

MUTATIONAL SCREENING IN FAMILIES HARBORING PATHOGENIC MUTATIONS FOR HEREDITARY HEMOCHROMATOSISF. Pallotti¹, P. Maroni³, S. Cattaneo³, R. Barberio², M. Rossi², D. Rossi³, G. De Luca¹¹Università degli Studi dell'Insubria, Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Varese²Lab. Analisi Chimico-Cliniche, Osp. di Circolo-Fondazione Macchi, Varese³Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Osp. di Circolo-Fondazione Macchi, Varese

Hereditary hemochromatosis (HH), one of the most common hereditary disorder in the Western world, is due to mutations in genes encoding for proteins responsible for the maintenance of iron homeostasis. Two of the most common mutations found both in carriers and unaffected people are the C282Y and the H63D in the HFE gene. Due to the potential serious damage to parenchymal organs, pharmacological prevention of iron accumulation is recommended for individuals of pedigrees in which at least one carrier of the above mentioned mutations is affected by clinical symptoms of iron overload.

Being the penetrance of the disease variable, it has been suggested the participation of environmental factors and/or "private" mutations in the phenotypic expression of HH.

In order to assess the presence and the penetrance of H63D and C282Y mutations, we screened for the presence of such mutations families of probands with clinical manifestation of HH and pedigrees in which the H63D mutation has been observed as occasional finding. Of the 7 families studied, one harbored the C282Y mutation, 2 were compound heterozygous C282Y/H63D, and 4 families had the H63D mutation. Clinical manifestations of HH were present in all the homozygous for the C282Y mutation and in all the compound heterozygous (all males), while only one male with C282Y in heterozygosity presented clinical features of HH. None of the individuals harboring the H63D mutation were affected, except for a single case of homozygous H63D in a young male. The C282Y mutation is transmitted as a pathogenic mutation, but the penetrance seems to be different even within a single family. The H63D mutation is transmitted as neutral polymorphism and such mutation is often present in a pedigree both in homozygosity and heterozygosity, not giving any clinical manifestation even in older age.

A population screening for mutations related to HH is not recommended, but it is important to focus the attention of pedigrees in which at least one individual present HH, bearing in mind that the variable penetrance of the mutations implies the presence of underlying "private" mutations which is possible to uncover using a molecular approach.

Bibliography

1. Qaseem a, et al (2005) Ann Int Med 143,517-521.

022

RE-EVALUATION OF PATIENTS WITH HEREDITARY HEMOCHROMATOSIS BY IMPROVING THE MUTATIONAL SCREENINGF. Pallotti¹, P. Maroni³, S. Cattaneo³, R. Barberio², M. Rossi², D. Rossi³, G. De Luca¹¹Università degli Studi dell'Insubria, Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Varese²Lab. Analisi Chimico-Cliniche, Osp. di Circolo-Fondazione Macchi, Varese³Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Osp. di Circolo-Fondazione Macchi, Varese

Hereditary hemochromatosis (HH), one of the most represented hereditary disorders in the western world, is due to mutations in genes encoding for proteins regulating the iron homeostasis. The most common mutations in genes regulating iron homeostasis are found in the HFE gene encoding for a protein (HFE) involved in the regulation of iron uptake at the cellular level, acting as an intracellular iron sensor. Two of these mutations (C282Y and H63D) are routinely screened for the presence in patients with primary disorders of iron overload by PCR/RFLP or by real time PCR.

The C282Y mutation, when heterozygous, could be associated with other mutations in the same gene, most of them considered as "private" or with peculiar regional distribution: In our region, two of the most frequent C282Y-associated mutations are the E168X and the W169X.

We recently improved the mutational screening by choosing a novel approach (reverse hybridization) for the search of 18 mutations responsible for HH (12 in HFE gene, including the E168X and the W169X, 4 in TFR2 gene, and 2 in the FPN1 gene) in order to look for an associated mutation in heterozygous patients and to confirm, using this mutational approach, the results previously found using the PCR/RFLP method.

On the bases of the aforementioned reasons, we selected for 50 patients affected by primary iron overload, including three patients negative for both H63D and C282Y mutations.

We confirmed the results of the previous molecular investigation for 49 of the patients. The only exception was the presence of the S65C mutation in the HFE gene found in heterozygosity in a patient previously found negative for H63D and C282Y. The 16 patients heterozygous for H63D or C282Y, were confirmed also by this analysis.

We can conclude that the most represented mutations related to HH in our region are H63D and C282Y, both in homozygosity or in heterozygosity or compound heterozygous, thus confirming the high pathogenicity of the C282Y mutation, and the importance of the secondary effectors (age-related, environmental) or "private" mutations in the phenotypic expression of the H63D mutation, the most diffuse mutation in the HFE gene.

Bibliography

1. Batts KP (2007) Mod. Pathol 20,S31-S39.

023

ESPERIENZA DI 7 ANNI NELLO STUDIO DELL'IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

F. Pateri¹, O. Turri¹, M. Erario¹, L. Ferri¹, H. Nadry¹, G. V. Melzi d'Eril², M. L. Biondi¹

¹Lab. di Chimica Clinica e Microbiologia, Az. Ospedaliera S. Paolo, Milano

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

L'ipercolesterolemia Familiare (FH) è una condizione autosomica dominante che colpisce 1/500 individui. E' caratterizzata da colesterolemia elevata (300-600 mg/dL) e LDL plasmatiche maggiori di 200 mg/dL. I pazienti con FH vanno incontro a malattia cardiovascolare aterosclerotica ad insorgenza precoce. Alla base della malattia c'è un deficit del recettore funzionale per le LDL. Il gene si trova sul cromosoma 19, comprende 18 esoni. A tutt'oggi sono state descritte circa un migliaio di mutazioni di vario genere su LDLR e per 859 di esse è stato trovato riscontro fenotipico per ipercolesterolemia. Dal 2000 nel nostro Laboratorio viene effettuato lo screening genetico sul gene LDLR. A tutt'oggi sono stati caratterizzati 391 soggetti con diagnosi clinica di ipercolesterolemia. Il gene LDLR viene analizzato tramite sequenziamento diretto. Nell'ultimo anno lo screening è stato effettuato tramite TGCE e seguito da sequenziamento solo per i campioni con profilo concorde alla presenza di mutazione. Su 391 soggetti analizzati 280 (176 bambini e 104 adulti; età da 1 a 80) sono risultati negativi allo screening. Mentre in 111 soggetti (85 bambini e 26 adulti; età da 2 a 47) è stata riscontrata una mutazione. Sono state descritte 61 diverse mutazioni: 5 inserzioni (7 pazienti), 7 delezioni (9 pazienti), 6 nonsense (11 pazienti), 24 missense (62 pazienti) e 7 splicing (9 pazienti). 12 delle mutazioni riscontrate non risultano a tutt'oggi descritte in letteratura (15 pazienti). Le mutazioni più frequenti da noi rilevate risultano comunque presenti in un numero di pazienti molto basso rispetto al totale dei casi (V502M: 13 soggetti, T705I: 6 soggetti, G571E: 6 soggetti, D200G: 6 soggetti). Inoltre alcuni dei soggetti portatori della stessa mutazione appartengono alla stessa famiglia. Tutto ciò conferma l'alto grado di eterogeneità allelica nell'ipercolesterolemia familiare e che la maggior parte delle famiglie hanno mutazioni private non riscontrate in altre famiglie. Per questo motivo lo screening dell'LDLR risulta particolarmente indaginoso (molto spesso è necessario screenare tutti i 18 esoni). L'utilizzo del TGCE come metodo di screening iniziale perciò si è rivelato particolarmente vantaggioso per ridurre sia i costi che i tempi di refertazione.

024

MUTAZIONE V617F DEL GENE JAK2 IN PAZIENTI CON DISORDINI MIELOPROLIFERATIVI

F. Sciarini¹, M. Beretta¹, R. Cecere¹, S. Signorini¹, D. Perego², P. Mocarelli¹, P. Brambilla¹

¹Servizio Universitario Di Medicina di Laboratorio, Osp. di Desio

²Divisione di Medicina, Osp. di Desio

Introduzione. La Policitemia Vera (PV) e la Trombocitemia Essenziale (TE) sono disordini mieloproliferativi cronici caratterizzati dalla proliferazione clonale dei precursori ematopoietici.

La scarsa conoscenza circa la patogenesi e l'assenza di marcatori specifici di queste malattie ha condotto alla ricerca di nuovi fattori prognostici.

Recentemente è stata descritta la mutazione puntiforme del tipo "gain of function" V617F a carico del gene JAK2 (Janus Kinase 2), una tirosin-chinasi citoplasmatica con funzione di trasduttore di segnale di diversi recettori per fattori di crescita (eritropoietina, trombopoietina, IL-3, G-CSF, GM-CSF). Essa ha assunto un ruolo centrale nella diagnosi di PV e in misura minore di TE.

Scopo. Messa a punto di un metodo per la determinazione della mutazione JAK2 V617F in pazienti affetti da PV o TE.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 32 pazienti: 25 PV (6F e 19M, età media 64 anni) e 7 TE (2F e 5M, età media 51 anni) in cura presso la Divisione di Medicina. Il DNA è stato estratto da granulociti con kit commerciale (Puregene DNA Purification System, Gentra). La mutazione JAK2 V617F è stata indagata, con metodo PCR-RFLP, utilizzando l'endonucleasi di restrizione BsaX I (New England Biolabs) e confermata mediante sequenziamento automatico (ABI PRISM 310, Applied Biosystems).

Risultati. La mutazione JAK2 V617F (G1849T) è stata riscontrata nel 60% (15/25) dei pazienti PV: 6 eterozigoti (G-T) (24%) e 9 omozigoti (T-T) (36%). La mutazione, invece, è presente nel 43% (3/7) dei pazienti con TE in forma eterozigote (G-T).

I due metodi utilizzati, PCR-RFLP e sequenziamento, hanno fornito risultati concordanti.

Conclusioni. I nostri risultati, che stiamo verificando su una casistica maggiore, mostrano una frequenza della mutazione simile a quella descritta in letteratura per PV e TE (2).

La mutazione JAK2 V617F rappresenta un marcatore utilizzabile nella diagnosi di PV e potenzialmente nel monitoraggio della terapia.

Bibliografia

1. Baxter EJ, et al. Lancet 2005;365:1054-1061
2. Kralovics R et al, NEJM 2005;352:1779-90

025

EVALUATION OF TWO SET OF PRIMERS FOR DETECTION OF IMMEDIATE EARLY GENE UL123 OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV)F. Sidoti¹, M. Bergallo¹, C. Costa¹, M. E. Terlizzi¹, S. Astegiano¹, F. Sinesi¹, R. Cavallo¹¹Dept. of Public Health and Microbiology, Virology Unit, University of Turin, Italy

Introduction. HCMV is a widespread agent causing a life-long persistent and generally asymptomatic infection in immunocompetent subjects. In contrast, immunocompromised patients are the most susceptible group to experience HCMV disease. First genes expressed during the replication are the immediate early (IE) genes, the products of which have pleiotropic effects on host cell metabolism [1]. Aim of this study was to compare two set of primers in the optimisation and standardisation of a RT-PCR assay for qualitative detection of mRNA encoded by the IE gene UL123 (IE1).

Methods. UL123 (IE gene-regulatory function) was amplified by a RT-PCR assay with two set of primers (A, B). The presence of cellular GAPDH transcript was analysed in order to evaluate RNA quality. PCR amplifications of UL123 cDNA were optimised by testing a wide range of Mg²⁺, primer, and deoxynucleotide triphosphate (dNTP) concentrations and two taq polymerase concentrations. Several annealing temperatures, starting at 5°C below the average melting point of primers, were used. To obtain well-characterized positive controls and to determine PCR sensitivity, a clone containing the complete target sequence for each UL123 transcript was used. 29 clinical samples obtained from 14 renal transplant recipients were tested.

Results. The optimal Mg²⁺, primer, dNTP, and taq concentrations were determined. PCR exhibited a high sensitivity for both set of primers for UL123 transcripts detection. Results about the evaluation of UL123 gene expression in the patients were as follows: 21/29 (72.4%) positive with set A vs 24/29 (82.8%) with set B. Only 1 sample was negative for UL123 transcript with set B and positive with set A; in contrast 4 samples were negative with set A and positive with set B. Our results confirm that during the two set of primers are able to determine the presence of UL123 HCMV transcript.

Conclusions: In conclusion, our two RT-PCR assays could provide a reliable, rapid and sensitive system enabling the detection and identification of UL123 transcripts and could be usefully employed to study the pathogenesis of HCMV-related diseases.

Reference1. Middelorp. *Organs Tissues* 2000;2:85-93.

026

MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE FILADELFIA-NEGATIVE: NUOVI FATTORI GENETICI?H. Nadry¹, F. Pateri¹, O. Turri¹, M. Erario¹, L. Ferri¹, G. V. Melzi d'Eril², M. L. Biondi¹¹Lab. di Chimica Clinica e Microbiologia, Az. ospedaliera S. Paolo, Milano²Dip. Med, Chir. e Odont, Università degli Studi di Milano

Introduzione. Le malattie mieloproliferative ph-negative (MPDs) sono caratterizzate da proliferazioni clonali delle cellule progenitrici nel midollo osseo e da differenti gradi di ematopoiesi extramidollare, associata ad un incremento di cellule CD34+ circolanti. La mobilitazione transitoria di cellule staminali emopoietiche e delle cellule progenitrici è stata attribuita all'induzione di un ambiente altamente proteolitico nel midollo osseo. Le metalloproteinasi (MMPs) hanno un ruolo centrale nel turnover della matrice extracellulare e sono implicate nella distruzione del tessuto connettivo e nel rimodellamento associato all'invasività tumorale e al processo di metastatizzazione. Sono stati descritti due polimorfismi nelle regioni dei promotori di due MMPs: il polimorfismo 1G/2G nel promotore della collagenasi interstiziale (MMP1) e il polimorfismo 5A/6A nel promotore della stromelisinina 1 (MMP3); gli alleli 2G e 5A sembrano determinare un'attività trascrizionale significativamente più elevata.

Scopo. Valutare i polimorfismi MMP-1 e MMP-3 associandoli alla suscettibilità e/o alla progressione di MPDs.

Metodi. 46 pazienti di cui 21 con policitemia vera (PV), 18 con trombocitemia essenziale (ET), 7 con mielofibrosi idiopatica (cIMF) e 133 controlli sono stati genotipizzati per questi due polimorfismi. I genotipi sono stati determinati tramite PCR-RFLP.

Risultati. La distribuzione genotipica di MMP-1 è risultata statisticamente differente tra pazienti e controlli (pazienti vs controlli; 1G/1G vs 1G/2G+2G/2G, 6% vs 26%; OR 4.78; CI% 1.35-25.22; p=0.007); per MMP3 il genotipo 5A/5A era meno rappresentato nei pazienti rispetto ai controlli (13% vs 27%; OR 2.59; CI% 0.97-8.07; p=0.04). Non è stata osservata nessuna correlazione con la dimensione della milza, la percentuale di CD34+ circolanti e la mutazione V617F di JAK2.

Conclusioni. I nostri risultati suggeriscono un ruolo di MMP1 e MMP3 nel rimodellamento della matrice extracellulare associato a MPDs. Sono comunque necessari ulteriori studi su una casistica più ampia per meglio comprendere il significato clinico dei polimorfismi delle metalloproteinasi.

027

POLIMORFISMO DELLE METALLOPROTEINASI 1 E 3: RISCHIO DI PROLASSO UTERINO?

L. Ferri¹, M. Erario¹, H. Nadry¹, O. Turri¹, F. Pateri¹, G. Melzi d'Eril², M. M. Ferrari³, M. L. Biondi¹

¹Lab. di Chimica Clinica e Microbiologia, Az. Ospedaliera S. Paolo, Milano

²Dip. Med, Chir. e Odont., Università degli studi di Milano

³Clinica Ostetrico-ginecologica Mangiagalli, Milano

Il prolasso genitourinario è una patologia comune. Circa l' 11% della popolazione femminile richiede almeno un intervento chirurgico correttivo.

Poco si sa sui fattori di rischio di questa patologia così comune, ma diversi lavori hanno riportato anomalie del metabolismo del collagene associate a prolasso degli organi pelvici e incontinenza. In tessuti vaginali di donne con prolasso uterino è stato trovato un ridotto contenuto di fibre collagene, rapporti differenti tra i vari tipi di collagene stesso e una aumentata espressione tissutale di metalloproteinasi che, come è noto, sono un gruppo di enzimi proteolitici coinvolti nel metabolismo della membrana basale e della matrice extracellulare.

Sono stati descritti due polimorfismi nelle regioni dei promotori di due MMPs: il polimorfismo 1G/2G nel promotore della collagenasi interstiziale (MMP1) e il polimorfismo 5A/6A nel promotore della stromelisin 1 (MMP3); gli alleli 2G e 5A sembrano determinare un'attività trascrizionale significativamente più elevata.

Abbiamo quindi studiato la distribuzione dei polimorfismi 1G/2G e 5A/6A in 82 pazienti sottoposte ad intervento chirurgico per prolasso uterino e 46 donne sane. Non si sono osservate significative differenze nella distribuzione dei genotipi (MMP1: pazienti: 1G/1G=18%, 1G/2G=49%, 2G/2G=33% vs controlli: 1G/1G=19%, 1G/2G=52%, 2G/2G=28%); (MMP3: pazienti: 5A/5A=17%, 5A/6A=62%, 6A/6A=21% vs controlli: 5A/5A=33%, 5A/6A=50%, 6A/6A=17%).

Dai nostri dati, da considerarsi comunque preliminari, possiamo escludere un coinvolgimento della componente genetica nella variazione del metabolismo delle metalloproteinasi 1 e 3 osservata nel prolasso uterino. I polimorfismi presenti nel loro promotore non possono quindi essere considerati fattori di rischio per lo sviluppo di questa patologia.

028

DETECTION OF HPV, BKV, JCV AND SV40 IN URINE OF HEALTHY INDIVIDUALS

L. Giuliani¹, S. Casciani¹, C. Ronci², R. Massarelli¹, G. Federici¹, C. Favalli², M. Ciotti², M. Dessi¹

¹University Hospital Tor Vergata, Dept. of Laboratory Medicine, Laboratory of Clinical Biochemistry, Rome

²University Hospital Tor Vergata, Dept. of Laboratory Medicine, Laboratory of Clinical Microbiology and Virology, Rome

Background. Many individuals are infected by polyomaviruses BKV and JCV during childhood. These viruses can persist in the kidney and reactivation can occur during immunodeficiency or immunosuppressive therapy. The monkey's polyomavirus SV40 infected human beings probably through contamination of the polio vaccine.

Human papillomaviruses (HPVs) can be detected in urine of infected individuals.

Objective. To determine the prevalence and the genotype of BKV, JCV, SV40 and HPV in the urine of healthy individuals, respectively.

Material and methods. Urine samples were centrifuged and the cellular sediment underwent to DNA extraction using DNA mini kit (QIAGEN, Germany). Amplification was carried out with primers specific for a conserved region of the T-antigen gene of BKV, JCV, and SV40.

HPV was amplified using the MY09/11 primers specific for a conserved region of the L1 gene.

Results. Of the twenty samples tested so far, 3 were positive for BKV (15%), 2 for JCV (10%), 2 for SV40 (10%), 3 for HPV (15%). Sequencing analysis confirmed our results.

Conclusion: These preliminary results suggest the polyomaviruses are widespread among population and can be detected in urine following their reactivation.

Urine could be used to screen recalcitrant individuals, especially men, with suspected HPV infection by a non invasive technique and with a type of sample easy to obtain.

Genotyping of the viruses could add important information on the circulation of viral strains among healthy individuals. Future studies are warranted to elucidate the role of polyomavirus genotypes in transplanted patients.

029

DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI DEL VIRUS DELL'EPATITE C (HCV) NELLA POPOLAZIONE AFFERENTE ALLA NOSTRA ISTITUZIONE

L. Tomasicchio¹, V. Cassano¹, R. Genco¹, F. Di Serio¹¹U.O. Patologia Clinica I, Policlinico Bari

Introduzione e scopo. Il virus dell'epatite C (HCV), appartiene alla famiglia delle Flaviviridae ed è un comune patogeno umano costituito da un genoma a singolo filamento di RNA di circa 9600 nt. Il genoma del virus dell'epatite C è altamente variabile e viene classificato, in base ad analisi filogenetiche della sequenza genomica, in 6 gruppi di genotipi, o cladi, ed in più di 70 sottotipi: i genotipi 1, 2, 4 e 5 vengono riferiti ai clades 1, 2, 4 e 5 rispettivamente, i genotipi 3 e 10 al clade 3 ed i genotipi 6, 7, 8, 9 e 11 al clade 6. Nel nostro studio abbiamo voluto valutare la distribuzione dei genotipi dell'HCV relativa ai pazienti afferenti alla nostra U.O.

Materiali e metodi. Per la determinazione del genotipo è stato utilizzato il test VersantTM HCV Genotipo (LiPA) (Siemens Medical Solutions Diagnostics) basato sull'ibridazione inversa su striscia di nitrocellulosa su cui sono blottate sonde specifiche per la regione 5'UTR. Dal 2002 il genotipo è stato valutato in 946 pazienti.

Risultati e conclusioni. Dei pazienti esaminati, 522 (55.18%) appartenevano al genotipo 1 e 361(38.16%) al genotipo 2; 47(4.97%), 14(1,48%) e 2 (0,21%) pazienti presentavano rispettivamente il genotipo 3,4 e 5. Relativamente al genotipo 1, l'86,21% dei pazienti apparteneva al sottotipo 1b, il 9,39% all'1a, il restante 4,41% era non sottotipizzabile. Questa percentuale di distribuzione è rimasta praticamente invariata fino ad oggi. Un aspetto particolare emerso da questa valutazione, è la distribuzione dei genotipi 3, 4 e 5 in base al sesso: su 66 pazienti, 53 (80,30%) appartenevano al sesso maschile e 13(19,70%) al sesso femminile. I nostri dati, in accordo con quanto riportato in letteratura, mostrano una spiccata prevalenza dei genotipi 1 e 2 (93,34% della popolazione totale); i restanti genotipi (3, 4, 5) sono espressi prevalentemente nella popolazione maschile.

Bibliografia

1. Pawlotsky JM.: Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clinical Liver Disease* 2003;7:45-66

030

ESPRESSIONE DEL GENE PRV-1 E MUTAZIONE JAK2 V617F IN PAZIENTI CON POLICITEMIA VERA

M. Beretta¹, F. Sciarini¹, S. Signorini¹, D. Perego², P. Mocarelli¹, P. Brambilla¹¹Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Osp. di Desio.²Divisione di Medicina, Osp. di Desio

Introduzione. La policitemia vera (PV) è un disordine mieloproliferativo cronico caratterizzato dalla proliferazione clonale dei precursori ematopoietici con aumentata produzione di eritrociti (1). Negli ultimi anni sono stati descritti alcuni marcatori di PV, tra cui l'aumentata espressione del gene PRV-1 (Policitemia-Rubra-Vera) nei granulociti e, recentemente, la presenza della mutazione puntiforme del tipo "gain of function" V617F del gene JAK2 (Janus Kinase 2), una tirosin-chinasi citoplasmatica con funzione di trasduttore del segnale di diversi recettori per fattori di crescita (eritropoietina, trombopoietina, IL-3, G-CSF, GM-CSF).

Scopo. Correlazione tra l'espressione del gene PRV-1 in granulociti e la presenza di mutazione JAK2 V617F in pazienti con PV.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 25 pazienti (6F e 19M, età media 64 anni) affetti da PV. La separazione dei granulociti, da 10 mL di sangue intero in EDTA, è stata effettuata tramite soluzione Percoll al 62% (Amersham). L'espressione di PRV-1 è stata valutata tramite real time RT-PCR (sonde TaqMan; analizzatore ABI PRISM 7900HT SDS Applied Biosystems), a partire da RNA estratto con Tri-Reagent (Sigma Aldrich) e utilizzando come gene di riferimento la β -actina (Human β -actin; Applied Biosystems).

Il DNA è stato estratto da granulociti con kit commerciale (Puregene DNA Purification System, Gentra). La mutazione JAK2 V617F è stata indagata, con metodo PCR-RFLP utilizzando l'endonucleasi di restrizione BsaX I (New England Biolabs) e confermata mediante sequenziamento automatico (ABI PRISM 310, Applied Biosystems).

Risultati. Il 52% (13/25) dei pazienti è positivo per la mutazione JAK2 V617F e mostra un'aumentata espressione del gene PRV-1 rispetto pazienti wild type (12/25).

E' stato riscontrato un indice medio di espressione genica ($2EXP-\Delta\Delta Ct$) di PRV-1 di 1.72, 5.62, 9.17 rispettivamente nei pazienti wild type (12), eterozigoti (8) ed omozigoti (7) per JAK2 V617F.

Conclusioni. I nostri dati confermano, in accordo con la letteratura, che la presenza della mutazione JAK2 V617F è correlata ad una maggiore espressione del gene PRV-1 (2).

Bibliografia

1. J. Poedt, et al. *Hematol. Oncol.* 2006;24:227-33
2. A. V. Jones et al. *Blood* 2005;106:2162-8

031

+3954 INTERLEUKIN-1B TT HOMOZYGOUS ITALIAN WOMEN ARE AT INCREASED RISK OF AN ANTERED VAGINAL FLORA CONDITION ASSOCIATED WITH PRETERM BIRTH

M. Di Santolo¹, G. Casabellata¹, K. Ryckman², S. M. Williams², S. Guaschino³, S. Cauci¹

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

²Center for Human Genetics Research, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA

³Dept. Reproductive and Development Sciences, IRCCS Burlo Garofolo Hospital, University of Trieste, Italy

Objective. We aimed to investigate whether interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) polymorphisms are associated with bacterial vaginosis (BV) in non-pregnant white women.

Methods. Genomic DNA was obtained from 164 BV positive, and 406 control women. Two diallelic polymorphisms in the IL-1 β gene (IL-1B) representing C/T base transitions at -511 and +3954 positions, and a variable number tandem repeats (VNTR) in intron 2 of the IL-1ra gene (IL-1RN) were assessed.

Results. We found that women who were homozygous for -511 CC or +3954 TT of the IL-1B gene were at increased risk for BV with an odds ratio (OR)=1.5 (95% CI=1.03-2.14, P=0.032), and OR=2.8 (95% CI=1.37-5.88, P=0.004), respectively. The haplotype -511/+3954 T-C was protective for BV, with an OR=0.7 (95% CI=0.49-0.90, P=0.009). The IL-1RN VNTR genotype was not associated with BV, although the rare allele 3 showed a trend towards protection (P=0.049).

Conclusion. Our data show that host genetic variants at the IL-1 β locus predispose to BV among Caucasian non-pregnant women. Further studies will determine whether these genetic polymorphisms modulate the risk for BV recurrence, and/or BV associated severe adverse outcomes as preterm birth and HIV transmission.

032

POLIMORFISMO DI OSSIDO NITRICO SINTASI ENDOTELIALE (ENOS) COME FATTORE DI RISCHIO PER LA DISFUNZIONE ERETTILE DI EZIOLOGIA VASCOLARE

M. Erario¹, L. Ferri¹, F. Pateri¹, O. Turri¹, H. Nadry¹, G. V. Melzi d'Eril², M. L. Biondi¹

¹Lab. di Chimica Clinica e Microbiologia, Az. Ospedaliera S. Paolo, Milano

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

Introduzione. Le cause della disfunzione erettile (ED) possono essere organiche, psicogene o dovute all'associazione delle due. Tra i casi di disfunzione erettile organica, il 40% coinvolge problemi vascolari derivati da disturbi circolatori arteriosi, oppure dall'occlusione di vene danneggiate, comunemente conseguenza di un rilassamento della muscolatura liscia.

L'ossido nitrico (NO), di derivazione endoteliale, prodotto dall'ossido nitrico sintasi in risposta ad un aumento del flusso sanguigno mantiene la tumescenza durante l'erezione.

Alcuni dei polimorfismi del gene eNOS sono stati associati allo sviluppo delle malattie cardiovascolari.

Scopo di questo studio, è quello di valutare la relazione tra i polimorfismi del gene eNOS e la disfunzione erettile (ED), in particolare confrontando la disfunzione erettile arteriogenica (aED) con quella provocata da altri fattori organici (naED).

Pazienti e metodi. Sono stati studiati 154 pazienti e 133 controlli maschi.

Dei 154 pazienti, 80 (di età compresa tra 19-36 anni) sono stati sottoposti ad eco-color doppler per la valutazione delle arterie dei corpi cavernosi dopo iniezione intracavernosa (ICI) di Prostaglandina E1 per indurre erezione.

I parametri di velocità del picco sistolico (PSV) sono stati valutati dopo 5, 10, 20 minuti dopo l'ICI.

L'ED vascolare è stato diagnosticato quando il flusso di PSV risultava inferiori a 35 cm/sec.

Pazienti e controlli sono stati genotipizzati per 2 frequenti polimorfismi descritti sulla eNOS endoteliale (Glu298 Arg e T-786C).

Risultati. La frequenza allelica risulta distribuita secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg. La distribuzione genotipica è significativamente differente tra casi e controlli (glu/glu+Glu/Asp vs Asp/Asp OR 3.82 [CI%1.54-10.74]p=0.0013). T/T+T/C vs C/C=OR 1.98 [CI%1.00-3.98]p=0.03. Il genotipo Asp/Asp è risultato essere significativamente più alto nei pazienti con aED rispetto ai pazienti con naED (glu/glu+Glu/Asp vs Asp/Asp OR 9.75[CI%1.31-4.25] P=0.01).

Conclusioni. I nostri risultati suggeriscono che i polimorfismi di eNOS giocano un ruolo come fattori genetici predisponenti per ED e che Glu298Asp rappresenta un ottimo marker di eziologia vascolare per ED.

033

AHSP EXPRESSION IN HEMOLYSIS ELEVATED LIVER ENZYME AND LOW PLATELET (HELLP) SYNDROME, INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION (IUGR) AND FETAL DEATH (IUFD)

P. Stortoni¹, M. Cecati¹, D. Sartini², V. Rossi², A. Corradetti¹, B. Landi¹, C. R. Vianna², S. R. Giannubilo¹, M. Emanuelli², A. L. Tranquilli¹

¹Ist. di Scienze Materno-Infantili, Università Politecnica delle Marche, Ancona

²Ist. di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Objective. Alpha hemoglobin-stabilizing protein (AHSP) inhibits the production of reactive oxygen species in various cells, including erythrocytes. Reduced AHSP can mean reduced protection from stressors. Our objective was to investigate whether AHSP is involved in the response to stress in pregnancy.

Study design. Placentas were collected from normal term pregnancies (n=10) and pregnancies complicated by HELLP (n=10), intrauterine growth restriction (IUGR) (n=10) or fetal death (IUFD) (n=6). AHSP mRNA and protein were determined using real time quantitative PCR and Western blot, respectively. All statistical analyses were performed by using the GraphPad Prism Software. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. Placental AHSP mRNA level in HELLP ($4.16E10^{-4} \pm 1.77$) and IUFD ($4.19E10^{-4} \pm 3.37$) were significantly decreased compared with controls ($28.47E10^{-4} \pm 14.86$; $p < 0.01$), whereas levels in the IUGR group ($7.55E10^{-4} \pm 6.4$) showed a trend toward being lower but the difference did not reach statistical significance. Western blot analysis results indicate a no significant increase of ASHP protein in the HELLP syndrome group and a significant decrease in the IUFD group compared with controls. There was no significant difference between the IUGR and control groups.

Conclusions. ASHP mRNA expression in the placenta is decreased in complicated pregnancies, and it may be involved in the pathogenic mechanisms leading to the adverse pregnancy outcome.

034

CORRELAZIONE TRA HPV-DNA E PAP-TEST: SETTE ANNI DI ESPERIENZA (DATI PRELIMINARI)

R. Russo¹, M. Scutellà¹, A. Villani¹, M. Bucci¹

¹U.O.C. Laboratorio Analisi P.O. "G. Vietri" Larino (CB), Azienda Sanitaria Regionale Molise

La correlazione tra infezione da Papilloma virus e sviluppo del carcinoma della cervice uterina è stata ampiamente dimostrata; infatti quella da HPV è il primo esempio di neoplasia indotta da virus. La maggior parte delle infezioni si risolve spontaneamente, ma non in tutti i casi. Il rischio di sviluppare un carcinoma cervicale è più elevato quando l'infezione persiste in soggetti di età superiore ai 30-35 anni, soprattutto quando l'infezione è sostenuta da sottotipi di HPV ad "alto rischio". HPV induce alterazioni cellulari evidenziabili con esame citologico (Pap Test). L'analisi della forma, delle dimensioni, del dettaglio dei nuclei e delle cellule permette di evidenziare le lesioni precancerose e cancerose indotte dal virus. Accanto al Pap test si è diffusa da anni la ricerca dell'HPV-DNA. Dal 2000 il ns. Laboratorio esegue con tecniche molecolari la ricerca dell'HPV-DNA; diversi metodi sono stati utilizzati fino a giungere agli attuali test IVD di ultima generazione. Sono stati sottoposti alla ricerca dell'HPV-DNA oltre 1.000 campioni di donne che contestualmente eseguivano il Pap-Test. La prevalenza dell'infezione nel campione esaminato è stata del 11%. Nel 54% dei campioni HPV positivi il Pap test non evidenziava lesioni citologiche (anche se il ginecologo nelle schede informative inviate al laboratorio segnalava su tali campioni un reperto infiammatorio all'esame obiettivo). Il Pap test dava nel 6% dei campioni lesioni condilomatose, nel 16% L-SIL, nel 2% H-SIL, nel 22% l'esito del Pap Test non era noto. Valutando l'età media di appartenenza dei campioni HPV-positivi/Pap test-negativi si evidenziava che ben il 37% del campione aveva un'età media compresa tra 30-40 anni e il 18% maggiore di 40 anni, cioè un'età in cui è maggiore il rischio di sviluppare lesioni cancerose. I dati preliminari, ancora in corso di elaborazione, dimostrano come il Pap Test, metodo di screening sempre valido con un buon rapporto costo/efficacia, non è immune da errori (errori di tipo umano nella lettura e/o nel campionamento). Invece le evidenze clinico-diagnostiche relative al test HPV-DNA ne dimostrano un valore addizionale.

Bibliografia

1. Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1228:F55-F78.

035

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX PCR FOR DETECTION AND TYPING OF MAJOR HUMAN HERPESVIRUSES IN CEREBROSPINAL FLUID

S. Astegiano¹, M. Bergallo¹, C. Costa¹, F. Sidoti¹, M. E. Terlizzi¹, R. Cavallo¹

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

Introduction. Infections of central nervous system (CNS) represent a difficult diagnostic problem for both clinicians and microbiologists. In particular, the Herpesviridae family plays a central aetiological role in CNS viral infections [1]. Prompt detection and diagnosis of CNS viral infections are critical because most infections are treatable, while a delayed recognition may lead to life-threatening conditions or severe sequelae. The traditional methods for detection of herpesviruses in CNS infections exhibit several drawbacks, while PCR on cerebrospinal fluid (CSF) has revolutionized the neurovirology and is become an essential part of the diagnostic work-up of patients with suspected CNS viral infections.

Methods. A sensitive multiplex PCR (mPCR) method was developed for simultaneous detection and typing of six human herpesviruses: human cytomegalovirus (HCMV), herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2), Epstein-Barr virus (EBV), varicella zoster virus (VZV) and human herpesvirus 6 (HHV-6), with the aim of simplifying detection and reducing time and costs.

Results. In order to evaluate the sensitivity and specificity of the assay for a low copy number of one virus in the presence of high copy number of other virus, amplification was performed with serial dilutions of template (10^3 to 10) in the presence of 10^4 copy of the other template. Amplified PCR products were detectable with 10 copies of pHCMV, pVZV and pHSV-1 with 10^2 copies of pHSV-2 and pEBV and with 10^3 copies of pHHV-6.

Conclusions. The mPCR developed in this study has been shown to be appropriate for the early and type-specific detection of HCMV, HSV-1, HSV-2, EBV, VZV and HHV-6 genomes in patients with suspected CNS infection. This method could be used both in diagnostic neurovirology and to conduct epidemiological and pathogenic studies on the role of herpesviruses in human disease and is able to prevent the risk of nested contaminations. It also could be utilized in the diagnostic work-up of patients with suspected CNS in association with the clinical and neuroimaging evaluation and in monitoring the efficacy of antiviral treatment.

References

1. Kennedy, P.G.E. 2005. Viral encephalitis. *J. Neurol.* 252:268-272.

036

ESTROGEN ROLE IN THE MODULATION OF NATRIURETIC PEPTIDE mRNA EXPRESSION IN MYOCARDIAL MOUSE TISSUE

S. Del Ry¹, M. Cabiati¹, V. Lionetti², D. Giannessi¹, S. Maffei¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry

²Sector of Medicine, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

Background. The mechanisms that mediate the cardioprotective action of steroid hormones in women are poorly understood. An important pathophysiological mechanism in cardiovascular disease is the imbalance between the vasoconstrictive/anti-natriuretic action of some neuroendocrine factors and the counter-regulatory vasodilatory/natriuretic effects of other factors, such as the cardiac natriuretic peptides (NP). The relationship between cardiac NP and female steroid sex hormones has been poorly investigated.

Aim. to investigate the estrogen role in the modulation of NP mRNA expression in myocardial mouse tissue.

Methods. We studied the expression of mRNA coding for brain NP (BNP), atrial NP (ANP), NPR-A (their main receptor) and estrogen receptor (ER) α in cardiac tissue of A) normal mouse (BALB/c mice, n= 6), B) ovariectomized mouse (sham, n=8) C) sham after somministration of 17- β -estradiol (5mg, 10 days, s.c; n=3) or D) 17- β -estradiol (25mg, 10 days, s.c; n=8). Total RNA was isolated from the cardiac tissue samples by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. To check the sensitivity and linearity of the amplification, RT-PCR for each primer was performed in a range of different number of cycles, annealing temperatures and RNA concentrations. GAPDH mRNA expression was determined as internal control.

Results. The optimal reaction conditions chosen were: 0.2 μ g of RNA; annealing time and temperature of 60 s at 59°, 61°, 57°, 61°, 55°C for GAPDH, BNP, NPR-A, ANP, ER α primers, respectively; 30 cycles for BNP, NPR-A, ER α and GAPDH, 35 for ANP; extension time of 10 min at 72°C. Bands were analyzed by Quantity One Software. RT-PCR analysis showed that BNP and ANP mRNA expression was higher in sham respect to controls (p=0.02; p=0.04, respectively) and that this expression resulted lower only after administration of higher 17- β -estradiol dose (B vs. D: p=0.0039; p=0.011 respectively). No difference was found in NPR-A mRNA expression while ER α mRNA resulted lower in sham and the treatment reversed this change.

Conclusions. Our data are consistent with other studies and suggest that steroid sex hormones can significantly affect the expression of cardiac NP.

References

1. De Bold et al. *Cardiovasc. Res*(1999);41,524-31.

037

mRNA EXPRESSION IN MYOCARDIAL TISSUE OF CNP, BNP AND THEIR MAIN RECEPTORS NPR-B AND NPR-A: A METHODOLOGICAL ASSESSMENTS. Del Ry¹, M. Cabiati¹, C. Colotti¹, V. Lionetti², M. Maltinti¹, D. Giannessi¹¹*CNR Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry*²*Sector of Medicine, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy*

Background. It has been indirectly demonstrated that C-type natriuretic peptide (CNP) is produced in the myocardium in heart failure.

Aim. To evaluate the expression of mRNA coding for CNP and its main receptor (NPR-B) in myocardial tissue by the use of RT-PCR. We also analysed BNP and NPR-A expression since cardiac tissue is the main site of synthesis for BNP.

Methods. Total RNA was isolated from cardiac tissue samples (BALB/c mice, n=5) by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. To check the sensitivity and linearity of the amplification, RT-PCR for each primer was performed in a range of different number of cycles, annealing temperatures and RNA concentrations. GAPDH mRNA expression was determined as internal control.

Results. The optimal reaction conditions chosen were: 0.2 microg of RNA; annealing time and temperature of 60 s at 59°, 61°, 69°, 63°, 57°C for GAPDH, BNP, CNP, NPR-B, NPR-A primers, respectively; 30 cycles for BNP, NPR-A and GAPDH, 40 for CNP and 35 for NPR-B; extension time of 72°C. Bands were analyzed by Quantity One Software.

The proposed method allowed us to detect the expression of mRNA coding for CNP and NPR-B in myocardial tissue confirming the presence of this effector in the heart. These preliminary data appear to indicate that CNP mRNA expression is lower with respect to that of BNP (CNP/GAPDH=0.117 vs. BNP/GAPDH=0.247) and that NPR-B is the predominant receptor in the heart (NPR-A/GAPDH=0.244±0.028; NPR-B/GAPDH=0.657±0.022; p=0.0008).

Conclusions. The determination of cardiac mRNA expression of CNP and NPR-B could constitute a useful tool to better study the role of this natriuretic peptide in experimental animal models of chronic heart failure.

References

1. Del Ry S, et al. C-type natriuretic peptide and heart failure. *Pharmacol Res.* 2006 Nov;54(5):326-33.

038

GLUTATHIONE REDOX BALANCE IN GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENT SUBJECTSS. Persichilli¹, B. Zappacosta², A. Minucci¹, M. Antenucci¹, P. Concolino¹, M. C. Santonocito¹, G. Agostinelli¹, C. Zuppi¹, B. Giardina¹, E. D. Capoluongo¹¹*Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*²*Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Giovanni Paolo II, Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso*

Background. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is a housekeeping enzyme that catalyses the conversion of glucose 6-phosphate (G6P) to 6-phosphogluconolactone, with concomitant reduction of NADP to NADPH. NADPH, via glutathione reductase, produces glutathione (GSH), responsible for detoxification of hydrogen peroxide and numerous toxic organic compounds.

The balance between oxidised and reduced form of GSH is crucial in red blood cell to ensure the adequate defence against toxic species.

In this study total, reduced and oxidised GSH levels were studied in a group of G6PDH deficient subjects and in a matched control group.

Methods. Total GSH, and its oxidized (GSSG) and reduced (GSH) forms were determined in 25 G6PD-deficient subjects, (17 males), typified by the PCR techniques and enzyme digestion (High Pure PCR Template Preparation Kit-Roche), by HPLC with fluorescence detection (Jasco, Tokyo, Japan).

Results. A significant decrease of t-GSH level was found in G6PD deficient group (7.3 vs. 12.3 $\mu\text{mol}/10^{12}\text{rbc}$). Moreover, a significant correlation between G6PDH activity and tGSH was found (p = 0.02). The ratio GSH/tGSH was significantly reduced in the deficient group (27.7% vs. 43.8%) while plasma GSH level was higher in this latter group (8.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ vs. 4.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$).

Conclusions. G6PDH deficient subjects show a significant unbalance of GSH redox status related to the severity of enzymatic loss activity. However, the high extracellular increase of GSH could be due to a mechanism of throw out from red blood cell to avoid the harmful increase of the oxidised form.

039

ANALISI PRELIMINARE DELLE FREQUENZE E DELLE ETEROZIGOSI DEI POLIMORFISMI DELLA TROMBOFILIA NEI PAZIENTI AFFERENTI ALL'OSPEDALE DI PIACENZA DAL 2005 FINO A MAGGIO 2007. (NOSTRA CASISTICA)

S. Vercesi¹, A. Kisialiou², B. Di Stasi¹, L. Santori¹

¹U.O. Patologia Clinica O.C. Piacenza

²Dip. Scienze Sanitarie, Lab. Statistica Medica Multivariata, Università di Pavia

Da quando è stato introdotto il test di screening in PCR per il rilevamento delle varianti alleliche delle mutazioni per: fattore II (G20210A), fattore V Leiden (G1691A) e MTHFR (C677T), presso il nostro laboratorio abbiamo raccolto una casistica di 617 pazienti provenienti dai reparti interni e dagli ambulatori esterni al Nostro Ospedale. La maggior parte dei pazienti risulta essere coinvolta direttamente o indirettamente (familiarità) con eventi vascolari acuti o cronici.

Metodo. Per tale scopo abbiamo utilizzato il kit di estrazione, amplificazione e rivelazione (LiPA) ALERT Q-PCR della Nanogen Advanced Diagnostics con sensibilità di circa 2000 molecole di DNA bersaglio nei 5 ul di DNA estratto.

Risultati. Le frequenze genotipiche riscontrate sono state: Per Fattore II: f(AA)=0%, f(GA)=6.16%, f(GG)=93.84%; Per Fattore V Leiden: f(AA)=0.16%, f(GA)=8.27%, f(GG)=91.57%; Per MTHFR: f(CC)=19.77%, f(CT)=55.43%, f(TT)=24.80%.

Le frequenze alleliche e loro SD riscontrate sono state:

per Fattore II: f(A)=0.03 +/-0.005;

per Fattore V Leiden: f(A)=0.04 +/-0.006;

per MTHFR: f(T)=0.53 +/-0.013;

I coefficienti d'inbreeding F riscontrati nei pazienti piacentini sono:

per Fattore II: -0.031;

per Fattore V Leiden: -0.003;

per MTHFR: -0.114.

Diff. maschi-femmine: la popolazione femminile totale presenta una deviazione significativa dall'equilibrio di Hardy-Weinberg con Pearson $\chi^2_{df=1} = 4.84$ (p=0.027) per MTHFR; mentre la popolazione maschile è in perfetto equilibrio con i valori attesi.

Il 5% del totale dei pz è di origine non italiana: la freq. allelica T di MTHFR è più alta nei pz piacentini (0.53 +/-0.014) rispetto ai non italiani (0.31 +/-0.047), con un effetto Wahlund (riduzione dell'eterozigosità) H del 7.36%; per il "fattore V" H risulta invariata; mentre per il "fattore II" H aumenta di 19.43%, riferibile all'effetto genetico delle migrazioni nel nostro territorio.

Bibliografia

Sasieni PD (1997) From Genotypes to Genes: Doubling the Sample Size. *Biometrics* 53, 1253-1261

Elston RC, Forthofer R (1977) Testing for Hardy-Weinberg equilibrium in small samples. *Biometrics* 33, 536-542.

Wahlund, S (1928) Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11:65-106.

040

IS PROTEIN C ASSAY A JUSTIFIED FIRST-LINE TEST FOR THROMBOPHILIA TESTING?

G. L. Salvagno¹, G. Lippi¹, M. Montagnana¹, M. Franchini², G. Poli¹, G. C. Guidi¹

¹Sez. Chimica Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona

²Serv. Immunoematologia e Trasfusione, Az. Ospedaliera di Verona

Background. Some inherited abnormalities, such as factor V Leiden mutation (FVL), activated protein C resistance (APCR) as well as deficiencies in antithrombin, protein C (PC) and protein S (PS), are associated with an increased tendency to develop venous thrombosis. Although the screening for these inherited thrombophilic disorders has become commonplace, indiscriminate testing is unjustified. On the basis of available studies, it is recommended to include PC, PS, APCR and FVL mutation in a first-line laboratory investigation. Although there is comprehensive information on the sensitivity of APCR for detecting FVL, lesser is known on the predictive value of this test for identifying PS and PC deficiencies.

Methods. We performed a retrospective analysis of PC, PS and APCR tests simultaneously performed between January 2004 and December 2006. The study was carried on at the Verona University Hospital, a primary care university teaching hospital with 750 beds that serves an area with a population of nearly 270,000 inhabitants.

Results. 240 consecutive patients simultaneously screened for PC, PS, APCR were identified. On overall, 59 patients had APCR <0.85 (25%), corresponding to the current recommended threshold for this assay. Among these patients, no one had PC values <70 UI/L, which is the lower limit of the reference range. 5 patients (3%) with APCR >0.85 had PC levels below the reference range, though none of them had values <55 UI/L. In ROC curve analysis, the area under the curve was 0.72 (p=0.013). At the 0.85 cutoff for APCR, the negative predictive value for identifying PC deficiencies was 100%, that for identifying PC values from 55 to 70 UI/L was 92%. Among the 59 patients with APCR <0.85, 7 (12%) had PS values <58 UI/L, which is the lower limit of the reference range. 8 patients (4%) among those with APCR >0.85 with had PS levels <58 UI/L. In ROC curve analysis, the area under the curve was 0.716 (p<0.0001). At the 0.85 cutoff for APCR, the negative predictive value for identifying PS deficiencies was 87%.

Conclusions. Results of this analysis attest that isolate APCR testing is not enough predictive to screen for either PC or PS deficiencies.

041

COAGUCHEK XS: A NEW INR PORTABLE MONITOR OF ROCHE DIAGNOSTICSL. Bassi¹, S. Testa¹, O. Paoletti¹, A. Alatri¹, G. Morstabilini¹¹Centro Emostasi e Trombosi, Azienda Istituti Ospitalieri di Cremona

Introduction. Portable coagulation systems are used to perform PT-INR test on capillary blood for monitoring oral anticoagulant therapy (OAT) in home patients and, in our centre, in patients managed in the peripheral health units. **Aim of the study.** to evaluate accuracy, precision and feasibility of a new portable PT monitor CoaguChek XS compared with CoaguChek S and PT-INR provided by central laboratory reference system.

Method.

-CoaguChek XS (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using a recombinant thromboplastin with an ISI of 1.0;

-CoaguChek S (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using freeze-dried rabbit thromboplastin with an ISI of 1.84;

-Reference system: magneto-mechanical coagulation analyzer STA-R (Roche Diagnostics) for PT-INR determination on venous blood specimens, using rabbit thromboplastin with an ISI of 1.31 (Neoplastin Plus Stago Paris, France) and a recombinant thromboplastin (Neoplastin R Stago Paris France) with an ISI of 1.04. Dual measurement were performed in the same analytical session.

The blood venous specimens were collected from 109 OAT patients (INR range 2-4) and 50 healthy volunteers; capillary INR was performed from two consecutive fingersticks by the two portable monitors.

Comparison among different systems was performed by linear regression and Bland and Altman method.

Results. The correlation among different systems was good, resulting in $0.80 < r < 0.93$. The better correlation was obtained between CoaguChek XS and Neoplastin. Bland-Altman statistical analysis showed good agreement among different systems, with 95% of total values included between ± 2 DS and ± 0.5 INR units. Results are shown in Table 1. CoaguChek XS resulted easier to use in comparison with CoaguCheck S.

Discussion and conclusion. We found a good agreement between the three different systems. CoaguChek XS and Neoplastin showed the better correlation, even if differences with recombinant thromboplastin were not statistical significant. CoaguChek XS has demonstrated to be accurate and easy to use.

042

MARKERS EMOCOAGULATIVI DI RISCHIO TROMBOTICO NEL BAMBINO OBESOM. Donato¹, D. Pascut¹, S. Parco¹, T. Princi², G. Tamaro¹¹Laboratorio Analisi IRCCS Burlo Garofolo, Trieste²Dipartimento di Fisiologia e Patologia, Università degli Studi di Trieste

Presenza di anticorpi antifosfolipidi (aPL), elevati livelli di lipoproteina(a) - Lp(a) ed obesità sono considerati tre fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di diverse patologie cardiocircolatorie. Per quanto riguarda il ruolo di questi tre fattori nella genesi della trombosi, la maggior parte degli studi è stata svolta sugli adulti e solo poca informazione riguarda i bambini. Il presente studio si propone pertanto di effettuare uno screening della popolazione pediatrica per valutare eventuali rischi trombotici. Abbiamo valutato 190 bambini obesi (BMI > 97° centile delle curve di Cole), 30 bambini sani e 60 adulti sani (30 maschi e 30 femmine), di controllo. Abbiamo dosato con metodica ELISA (Bouty) su micropietra gli anticorpi aPL di classe IgG e IgM e la Lp(a). Il 2,1% dei bambini obesi è risultato positivo al test di screening per gli anticorpi aPL. L'analisi dei valori ematici della Lp(a) nei soggetti obesi ha evidenziato una tipica distribuzione skewed, con il 4,74% dei soggetti ad alto rischio ed il 5,3% dei soggetti a basso rischio. Pure nei bambini sani e negli adulti sani sono state riscontrate un'analoga percentuale di anticorpi aPL nonché distribuzione della Lp(a) ove però la percentuale di soggetti adulti ad alto rischio è risultata essere più alta (17,5%), in particolare nelle donne in post-menopausa. La probabilità di sviluppare eventi trombotici è aumentata quando un soggetto possiede molteplici fattori protrombotici. Tuttavia, proprio in virtù del loro elevato BMI, i bambini obesi possiedono un fattore di rischio per lo sviluppo di trombosi, che in età adulta potrà associarsi all'aumentata Lp(a) e alla comparsa di aPL.

Bibliografia

Levine JS, Ware Branch D, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Eng J Med* 2002;346(10):752-63.

043

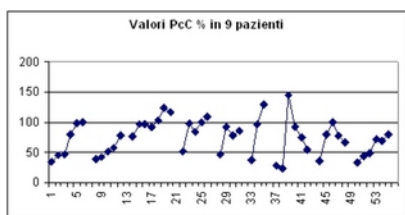
ANDAMENTO DEI VALORI DI PROTEINA C DELLA COAGULAZIONE IN PAZIENTI CON SEPSI GRAVEM. Falcone¹, F. Simone¹, G. Carrillo¹, A. Lepore¹, S. Colelli¹, A. Cinquesanti¹¹Az. Ospedaliero Universitaria OO.RR. di Foggia, SC 1° Laboratorio Analsi Cliniche, * SC di Rianimazione

Presso la Rianimazione degli OO.RR. di Foggia si è intensificato la cura di sepsi gravi con l'infusione di Concentrati di proteina C della coagulazione (PcC) e pertanto pervengono diverse richieste di dosaggio della PcC.

Obiettivi: documentare l'andamento dei valori di PcC durante le terapie intensive con infusione di concentrati della PcC. Per l'analisi di PcC si utilizza Technochrom Protein C (Alifax – Padova) che utilizza: estratto di veleno, substrato, tampone e lettura in cinetica a 405 nm, valori di rif. 70-130%. Si eseguono per ogni paziente diverse determinazioni per i giorni di terapia. I clinici seguono i protocolli pubblicati per l'utilizzo di Ceprotin (Proteina C di origine umana) in pazienti pediatrici e Xigris (Proteina C attivata endogena prodotta mediante ing. genetica) in pazienti adulti. La maggioranza dei pazienti proviene da importanti interventi di chirurgia. Le indicazioni per l'infusione di PcC prevedono alterazioni varie: temperatura corporea > di 38°C, frequenza cardiaca > 90 battiti/min, frequenza respiratoria > 20 respiri/min, GB>12.000/uL, ecc.. I valori iniziali di PcC sono molto bassi, ma celermente tendono a salire nei giorni seguenti per l'infusione dei concentrati di PcC. Nella figura sono riportati i dati di 9 pazienti che in seguito a trattamento mostrano l'incremento dei valori di PcC. I clinici riferiscono di situazioni gravissime che, in seguito a terapia con PcC, sono nettamente migliorati. La presente comunicazione, che fa parte di un più ampio progetto di studio, vuol riportare la importante variazione di un dato di laboratorio che cambia in seguito a terapia. Il monitoraggio farmacologico dona al clinico una obiettività in più per ponderare quelle scelte curative che tante volte si rivelano decisive per il successo di una procedura.

References

1. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2007 Mar 10;369(9564):836-43
2. Xigris: reducing mortality in adult patients with severe sepsis. *Urol Nurs*. 2002 Jun;22(3):200-1



044

CONFRONTO DI METODICHE APPLICATE ALLO STUDIO DELLA OMOCISTEINAM. Tani¹, B. Milanese²¹Responsabile U.O.Semplice Lab.Analisi P.O. Gavardo-Salò - A.O. Desenzano del Garda²Responsabile U.O. Complessa Servizio di Patologia Clinica - A.O. Desenzano del Garda

Scopo del nostro lavoro era di adattare un kit diagnostico in vitro, per la determinazione quantitativa della omocisteina totale (HCY) nel siero umano, plasma eparinizzato o EDTA validato per la tecnica immunonefelometrica al lattice con i sistemi BNII®, sull'analizzatore centrifugo BCS Dade-Behring®. I campioni sono stati valutati oltre che con le strumentazioni citate anche con il metodo di riferimento (CLIA) utilizzato nel nostro Laboratorio. Abbiamo analizzato campioni di plasma EDTA provenienti da 100 pazienti, di entrambe i sessi in età compresa fra i 18 ed i 65 anni utilizzando un cut-off di 15 µmol/L. Per valutare la correlazione è stato utilizzato il calcolo della regressione lineare secondo Passing e Bablock rilevando per CLIA vs BNII $r^2 = 0,91$, CLIA vs BCS $r^2 = 0,817$, BNII vs BCS $r^2 = 0,83$. Il coefficiente secondo Pearson ottenuto nello stesso ordine ha rivelato $r=0,93, r=0,91, r=0,89$. La differenza fra le medie per nefelometria e turbidimetria nei confronti della metodica CLIA ha mostrato un bias positivo: 0,460 µmol/L CLIA vs BNII (al 95% intervallo di confidenza 0,028 – 0,891), CLIA vs BCS 1,040 µmol/L (al 95% intervallo 0,511-1,568), BNII vs BCS 1,494 µmol/L (al 95% intervallo 0,979-2,009). Le prove eseguite su BCS hanno mostrato linearità fra 10 e 100 µmol/L, recupero 97,7 – 102,3%. Precisione intra-interassay ed accuratezza sono state eseguite su N/T Controllo Proteine SL/L e SL/M Dade-Behring®. Per quanto riguarda la accuratezza abbiamo ottenuto con BNII CV% -6,93, con BCS 1,25% sul livello basso, per il livello medio con BNII CV% 3,73, per BCS CV% 0,84. La precisione intra-assay sui medesimi controlli CV% 1,08 CV% 3,30 per lo strumento BCS, CV% 4,9 e CV% 2,61 per lo strumento BNII. Nella valutazione interassay CV% 4,86 e 3,06 per lo strumento BNII, mentre CV% 4,96 e 1,42 BCS. La sperimentazione oltre a rilevare una buona correlazione con il metodo di riferimento, mostra che la performance del kit al lattice applicato su coagulometro consente di correlare i dati ottenuti utilizzando il medesimo reattivo già validato su nefelometro, consentendo il dosaggio di HCY, marcatore di trombofilia, su strumentazione affine.

“Focus on homocysteine and vitamins involved in its metabolism” C. Bolander-Gouaille Second Edition—Springer 2002.

045

COADATA 501 S PORTABLE INR MONITOR: ACCURACY, PRECISION AND COST EVALUATION IN COMPARISON WITH COAGUCHEK SS. Testa¹, O. Paoletti¹, A. Alatri¹, G. Morstabilini¹, A. Fugazza¹, L. Bassi¹¹Centro Emostasi e Trombosi, A.O. Istituti Ospitalieri di Cremona

Introduction. Portable coagulation systems are used to perform PT-INR test on capillary blood. These instruments can be used for monitoring oral anticoagulant therapy (OAT) in home patients or in patients followed in peripheral health units. This management has demonstrated to be useful to improve patient's quality of life.

Aim of the study. -to evaluate precision, accuracy and feasibility of Coadata 501 S portable PT monitor compared with CoaguChek S in a peripheral health care unit, connected with the anticoagulation clinic by a telemedicine system.

-to compare costs between systems

Method. -Coadata 501 S (Alfa Wasserman Diagnostics) using a brain rabbit thromboplastin with an ISI of 1.1;

-CoaguChek S (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using freeze-dried rabbit thromboplastin with an ISI of 1.84;

Dual capillary INR measurements were performed in 155 OAT patients with PT INR ranging from 1.0 to 6.0.

Comparison of different systems was performed by linear regression and Bland and Altman statistical analysis.

RESULTS: The coefficient correlation among the two different systems was 0.82. The linear regression equation was $y=0.74x + 0.62$ with $p<0.0001$. Bland-Altman analysis showed a good agreement with 95% of total values included between ± 2 DS. Furthermore we have calculated the proportion dual INR measurements within ± 0.5 INR units at 4 different INR ranges:

1. INR range 1.0-1.99: 90% of agreement
2. INR range 2.0-2.99: 93% of agreement
3. INR range 3.0-3.99: 67% of agreement
4. INR range 4.0-6.0: 50% of agreement

Global costs of the two portable monitors were evaluated. We found an advantage for Coadata system, resulting in 1 € less expensive for each PT determination, considering groups of at least 20 patients.

Discussion and conclusion. Results showed good correlation between the two different systems. Total agreement is better at INR level <3 . Coadata portable monitor is more economic in comparison with CoaguChek S; but less easy to use. Therefore it is a good system for PT/INR determinations in selected patients at peripheral health units, if used by professional trained staff.

046

EVALUATION OF A NEW QUANTITATIVE D-DIMER METHOD BASED ON DRY CHEMISTRY: INNOTRAC AIO!S. Testa¹, O. Paoletti¹, A. Alatri¹, G. Morstabilini¹¹Centro Emostasi e Trombosi, A.O. Istituti Ospitalieri di Cremona

Introduction. D-dimer is a cross-linked fibrin degradation product released into the circulation during the process of blood clot breakdown. It is used as early sensitive marker for thrombotic disorders to rule out venous thromboembolism (VTE) when its concentration is below a clinically validated cut-off. The results of different quantitative D-dimer tests can differ significantly because of the variety of fibrin degradation products in plasma, the specificity of assays and the calibrators used.

Aim of study. Evaluation of a new quantitative dry reagent immunoassay, Innotracc Aio D-dimer, compared with Vidas D-dimer bioMerieux method.

Method. Assays were performed on 91 consecutive emergency room in-patients with symptoms that suggested VTE, 114 neoplastic patients and 51 healthy subjects (men=25, women=26). The blood venous specimens were centrifugated at 3000 r.p.m. for 10 min and then analyzed by automated Aio Immunoanalyzer (Innotracc Diagnostic) and Vidas analyzer. Aio D-dimer assay is based on dry chemistry and fluorometry detection; Vidas assay is an automated quantitative enzyme-linked immunoassay based on fluorescent detection. Statistical analysis was performed for the three patient groups. We calculated Roc curve, correlation coefficient, linear regression equation and Bland Altman graphic to analyzed data.

Results. Roc curve was calculated at Vidas value cut off of 500 ng/mL for excluding VTE. Area under the curve was 0.98 (Table 1). At this cut off value Aio method sensibility is 96.92 (95% CI= 89.32% to 99.63%) and specificity is 80.77%. However, the better cut-off for Aio method is resulted 608 ng/mL, because the specificity rises to 88.46% without significant modifications of sensitivity (95.38%; 95% CI=87.10% to 99.04%). Linear regression analysis showed good agreement between two methods as well as the Bland-Altman analysis despite an overestimation of results obtained with Aio test.

Conclusion. Our study showed a relatively good correlation between the new rapid Aio D-dimer assay and the Vidas D-dimer assay. Even if high variability among different D-dimer tests is well-known, this new method showed a good sensitivity and specificity for VTE. To improve specificity strongly bound to VTE, a recalculation of cut off values should be performed.

047

LA LISTA DI RISCONTRO INTEGRATA ISO 9001:2000 vs ISO 15189:2003

A. Cremaschi¹, A. Vernocchi², E. Fugacci¹, L. Invernizzi¹, O. Zanchi¹, B. Pirovano², C. Regonesi², E. Piazza², R. Possenti², R. Vitaloni²

¹Ufficio Qualità Accreditamento Azienda Ospedaliera di Treviglio

²Servizio di Medicina di Laboratorio Azienda Ospedaliera di Treviglio

Introduzione. Gli audit interni consentono di verificare l'efficacia delle attività di miglioramento del "Sistema Qualità Laboratorio". Allo scopo si devono utilizzare strumenti guida nello svolgimento dell'audit capaci di approfondire gli elementi critici dei processi gestiti. Per questo la costruzione di liste di riscontro integrate ISO 9001:2000 vs ISO 15189:2003 rappresenta un momento chiave del miglioramento.

Discussione. Nella preparazione dell'audit interno è di fondamentale importanza predisporre la lista di riscontro, quale elemento di supporto all'Auditor per assicurare un'esaustiva analisi nel corso dell'indagine. Essa rappresenta il modello di gestione preso a riferimento, che per la Medicina di Laboratorio è costituito dalla norma ISO 15189:2003.

È compito del Gruppo di Audit, pertanto, integrare la lista di riscontro, già eventualmente predisposta sui requisiti ISO 9001:2000, con quelli caratterizzanti l'attività di Laboratorio contenuti nella ISO 15189. Nel requisito 4. Management requirements, suddiviso nei diversi sottoparagrafi, la capacità gestionale è perseguita in modo parallelo nelle due norme prese a riferimento. Specifica appare invece la declinazione del requisito 5. Technical requirements, che si esplicita nei sottoparagrafi 5.1 Personnel, 5.2 Accommodation and environmental conditions, 5.2 Laboratory equipment, 5.4 Pre-examination procedures, 5.5 Examination procedures, 5.6 Assuring quality of examination procedures, 5.7 Post-examination procedures, 5.8 Reporting of results. A queste parti la lista di riscontro deve riferirsi, senza trascurare di trarre requisiti di indagine dal Annex B Recommendations for protection of LIS, e Annex C Ethics in laboratory medicine.

Conclusioni. Uno strumento efficace come la lista di riscontro integrata con i requisiti della ISO 15189 fornisce al Team Ispettivo una guida per la conduzione di Audit interni che puntino sugli aspetti critici dei processi di Laboratorio, senza trascurare gli elementi che qualificano il personale ed i servizi di supporto, come il sistema informativo, aspetti cruciali per il miglioramento delle attività in applicazione ai principi di etica di Laboratorio.

Bibliografia

ISO 15189:2003

ISO 9001:2000

048

L'IMPLEMENTAZIONE DI UN SISTEMA DEDICATO PER LA DETERMINAZIONE DEI FARMACI MIGLIORA SIGNIFICATIVAMENTE L'IMPRECISIONE DELLA LORO MISURA

A. Dolci¹, L. Scapellato¹, P. Luraschi¹, M. Panteghini¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera L. Sacco, e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano

Scopo. Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente modificato l'organizzazione della determinazione delle concentrazioni plasmatiche dei farmaci mediante l'introduzione di una strumentazione esclusivamente dedicata alla loro misura (Roche Cobas Integra 400) al posto del precedente consolidamento di molte misure immunochimiche, farmaci inclusi, sullo stesso analizzatore (Siemens ADVIA Centaur). In questo lavoro, abbiamo valutato l'imprecisione delle due soluzioni analitiche nella determinazione dei principali farmaci.

Metodi. Nell'anno 2006 la determinazione dei farmaci è stata eseguita per i primi 7 mesi sul Centaur ed in seguito (5 mesi) sul sistema Integra 400. La valutazione dell'imprecisione di queste misure è stata ottenuta mediante l'esecuzione di un CQI che prevedeva in ciascuna serie analitica la misura di uno stesso materiale di controllo liquido-congelato (BioRad Liquichek Unassayed Chemistry Control Human Level 2) prima sul Centaur e poi sull'Integra, senza alcuna interruzione.

Risultati. I risultati dell'imprecisione dei metodi valutati, espressi come CV mediano dei rispettivi CV mensili, sono riportati in tabella. E' evidente dai dati la migliore precisione del sistema Integra rispetto all'ADVIA Centaur in precedenza utilizzato per tutti i farmaci determinati, ad eccezione della digossina, la cui entità di variazione già buona sul Centaur (3,1%) è rimasta tale anche sull'Integra (3,6%).

Conclusioni. Non essendo differenze di imprecisione così marcate esclusivamente riferibili ad una diversa prestazione strumentale, la nostra esperienza dimostra che l'introduzione di un sistema esclusivamente dedicato ai dosaggi dei farmaci rispetto ad un consolidamento delle loro misure in un insieme più eterogeneo può migliorare significativamente la variabilità della loro determinazione.

	n	Centaur		n	Integra	
		Media	CV, %		Media	CV, %
Vancomicina, mg/L	72	36,3	4,8	43	47,9	2,5
Teofillina, mg/L	84	24,3	8,2	34	22,6	2,3
Fenitoina, mg/L	100	28,2	6,0	51	25,6	2,6
Fenobarbitale, mg/L	90	64,2	7,5	69	44,7	2,6
Digossina, µg/L	95	3,2	3,1	92	3,5	3,6
Carbamazepina, mg/L	104	13,0	8,8	81	15,5	6,7
Valproato, mg/L	104	143,5	6,8	95	154,4	3,9
Gentamicina, mg/L	67	6,8	5,6	34	6,9	2,5

049

NON COMMUTABILITA' PER IL SISTEMA ANALITICO COBAS INTEGRA DEI MATERIALI DI CONTROLLO UTILIZZATI NELLA VEQ PER LA HbA1C

A. Dolci¹, L. Scapellato¹, M. Milano¹, R. Paleari¹, A. Mosca¹, M. Panteghini¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera L. Sacco, e Centro per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi, Milano

Recentemente è stata introdotta nel nostro laboratorio la determinazione immunometrica dell'HbA1c mediante il sistema Roche Cobas Integra 400. Le prestazioni della misura sono state sottoposte al Programma Intersocietario VEQ che negli esercizi effettuati nel 2° semestre 2006 ha mostrato un costante errore di sovrastima (+10,1% \pm 0,32%, n=4) rispetto ai valori assegnati con metodo di riferimento DCCT. Tale prestazione è stata classificata come non accettabile dall'organizzatore della VEQ. Analizzando i dati forniti dai partecipanti del gruppo Integra si è potuto, tuttavia, dimostrare che tale sovrastima era mediamente comune alla maggioranza di loro. Due erano quindi le possibili spiegazioni: 1. il sistema non è correttamente standardizzato rispetto al metodo di riferimento o 2. il materiale utilizzato per la VEQ non è commutabile per la metodica Integra. Avendo acquisito dati dal produttore che certificavano la riferibilità del sistema (1), abbiamo deciso di verificare sperimentalmente il secondo punto.

Sono stati analizzati 58 campioni di sangue intero fresco (WB) (HbA1c tra 4,6% e 8,8%) e 22 materiali di controllo per VEQ, 8 utilizzati nel 2005 (05), 8 nel 2006 (06) e 6 di diversa produzione (NEW). Tali campioni sono stati determinati su Integra 400 e in HPLC Tosoh G7, sistema per il quale era stata in precedenza dimostrata la commutabilità di tutti i materiali VEQ valutati nei confronti del metodo DCCT. La commutabilità dei materiali VEQ era stimata utilizzando come limite di accettabilità (LAC) un valore compreso tra \pm 2,5% lo scostamento medio (Sm) percentuale ottenuto sui campioni WB.

Considerando i campioni WB, lo Sm Integra rispetto ad HPLC era 1,35% (DS 2,6), con LAC compreso tra -1,15% e +3,85%. Tutti i campioni 06 (Sm +8,2%) e 7/8 05 (Sm +6,5%) non erano commutabili. Al contrario, 5/6 campioni NEW (Sm +1,8%) erano commutabili per i metodi valutati. La correlazione tra i metodi nella misura dei campioni WB era Integra = 0,91 HPLC + 0,71% (r=0,998), a dimostrare la diversa specificità dei due metodi utilizzati.

I materiali attualmente utilizzati nella VEQ per l'HbA1c non sono commutabili per il sistema Integra. E' consigliabile la loro sostituzione con materiali di tipo NEW.

Bibliografia

1. Groche D, et al. Clin Lab 2003;49:657.

050

LA COSTRUZIONE DI UN PERCORSO DI MIGLIORAMENTO CONTINUO, ATTRAVERSO L'ASCOLTO E OLA COMUNICAZIONE CON UTENTI ED OPERATORI: L'ESPERIENZA DI UN LABORATORIO DA POCO CERTIFICATO

C. Martini¹, S. Secondini¹, B. Brunella¹, C. Morosetti¹, F. Piersantelli¹, E. Renzi¹, P. Pauri¹

¹U.O. Patologia Clinica, Ospedale di Jesi (AN), ASUR Marche Zona territoriale 5

La nostra U.O. ha intrapreso un dialogo con tutti i propri utenti allo scopo di implementare un Total Quality Management e migliorare il SGQ, certificato UNI EN ISO 9001:2000 per i quali la focalizzazione sul cliente, lo sviluppo ed il coinvolgimento del personale, la misurazione della qualità ed il miglioramento continuo, sono i principi di base.

Abbiamo realizzato una Carta dei Servizi in diversi formati: versione completa, versione ridotta per utenti esterni e per utenti interni, brochure, tabelle prestazioni con modalità di invio e raccolta del materiale biologico, e in diversi supporti: cartaceo ed informatico intranet e internet (www.asurzona5.marche.it)

L'informazione del servizio all'utente è stata realizzata anche mediante audiovisivi dell'attività del laboratorio proiettati in sala di attesa, brochure informative e cartellonistica.

Abbiamo inoltre effettuato tre indagini di customer satisfaction differenti per le diverse tipologie di utenti afferenti al nostro servizio: gli utenti esterni, gli utenti interni (medici e caposale delle U.O. del Presidio), i MMG e i Pediatri di Libera Scelta (PLS) della Zona Territoriale 5. Per gli operatori del laboratorio abbiamo effettuato un'indagine sul clima interno.

Abbiamo pianificato i questionari ed elaborato i dati applicando la norma UNI 11098. La soddisfazione complessiva nei tre casi ha portato ad un voto del Servizio (da 1 a 10) pari a 7,9 per gli utenti esterni, 7,2 per gli utenti interni, 7,9 per i MMG e PLS.

Utilizzando quindi l'analisi di Pareto e la matrice delle priorità di intervento abbiamo deciso di intraprendere alcune azioni di miglioramento (AM): formazione sulla comunicazione, condivisione con i clinici richiedenti delle iniziative per il miglioramento dell'appropriatezza della richiesta, formazione sulla modalità di raccolta dei campioni biologici (controllo fase pre-analitica), invio report di positività delle infezioni alle U.O., miglioramento della gestione privacy degli utenti e collegamento internet con i MMG e PLS.

Le AM intraprese sono state sia di carattere organizzativo che metodologico, sempre nell'ottica dell'utente al centro del sistema, permettendo così la costruzione di un percorso di condivisione e partecipazione tra operatori, pazienti, MMG e PLS.

051

COME LIMITARE LE INCERTEZZE DELLE FASI EXTRA-ANALITICHE: L'ESPERIENZA PRELIMINARE DI MULTILAB

E. Longhi¹, L. Mauro¹, M. Zabeo¹, B. Bianchi¹, M. Barberis¹

¹MULTILAB, Multimedica Holding S.p.A.

Scopo. Licenziata la fase iniziale di caratterizzazione delle variabili extra-analitiche attraverso il modello VISION 2000, la Direzione di Multilab si è data alcuni indicatori di qualità per meglio valutare l'andamento di alcune di queste variabili nell'ottica del miglioramento continuo.

Metodologia. Dopo aver introdotto nuovi aggiornamenti sulle procedure di rilevazione degli errori extra-analitici, si è provveduto in via sperimentale alla definizione ed alla raccolta degli indicatori di qualità della fase preanalitica (PREA) (%NC rilevate), analitica (A)(CQ fuori range di VEQ) e postanalitica (POSTA) (tempi di refertazione). Sono state prese in considerazione le NC che rappresentano l'80% delle NC rilevate secondo l'analisi di Pareto. Per la fase PREA quelle relative alla temperatura di trasporto non idonea alla conservazione dei campioni, (47.8% del tot. della fase PREA) alla non corretta compilazione delle bolle di accompagnamento (13.3%), alle provette con barcone non leggibile, assente o mal posizionato (11.5%) ed al campione non pervenuto (8.0%). Per la fase A i valori di CQ fuori range della VEQ (86.6% del tot. della fase A), per la fase POSTA i ritardi di consegna dei referti per ripetizione di batch di analisi (19.2% del tot. della fase POSTA), per approfondimenti diagnostici (17.7%) e per fermo strumentale (12.4%). Sono stati posti successivamente i seguenti obiettivi: fase PREA l'1.25% di NC in rapporto al n° di test eseguiti; fase A il raggiungimento di un punteggio medio globale da 1.5 a 2.0; fase POSTA una percentuale di ritardi nella consegna dei referti inferiore al 4%.

Risultati. L'indice di NC rilevato è stato dello 0.5% (obiettivo raggiunto); leggero scostamento dall'obiettivo stabilito per chimica clinica (1.43) e coagulazione (1.27), la percentuale di ritardi nella consegna dei referti è stata inferiore al 4%. **DISCUSSIONE** Con una standardizzazione delle procedure di rilevazione e monitoraggio delle NC, della VEQ e dei tempi di refertazione è possibile caratterizzare alcuni indicatori di qualità per valutare nel dettaglio i meccanismi che li governano.

Bibliografia

1. Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, et al. Laboratori network of excellence: enhancing patient safety and service effectiveness. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:150-60.

052

UNA PRIMA ESPERIENZA DI CONTROLLO DI QUALITÀ INTERLABORATORI SU BASE NAZIONALE PER LA DIAGNOSTICA DELLA REAZIONE OLIGOCLONALE LIQUORALE

G. Bernardi¹, E. Ciusani¹, M. Codonesu², D. Croci¹

¹Fondazione Istituto Neurologico C. Besta, Milano

²Alfa Wassermann, Milano

Il controllo di qualità per la diagnostica liquorale è ben consolidato ma non molto diffuso (Reiber H. et al. *ClinChemLabMed* 2003;41:331-337). Per gli esami di Il livello in Italia è possibile partecipare a programmi internazionali, non essendoci offerte italiane, se non quanto realizzato su base volontaria e gratuita (es: AINO).

Abbiamo chiesto ad un gruppo di laboratori, di valutare 3 campioni di siero e liquor per la presenza di bande oligoclonali. Lo scopo era di valutare, in laboratori che usano tutti lo stesso metodo commerciale (Helena, Alfa Wassermann), l'influenza di alcuni parametri sulla corretta esecuzione ed interpretazione dei risultati (strumentazione, reazione diretta o indiretta, lotto reattivi). Abbiamo preparato, utilizzando dei pool, tre coppie di campioni di liquor (tal quale) e siero (diluito) che abbiamo nominato 1, 2 e 3.

La presenza di bande oligoclonali è stata da noi valutata con il metodo internazionalmente riconosciuto come "gold standard": isoelettrofocalizzazione seguita da blotting e rivelazione delle IgG con chemiluminescenza. Abbiamo chiesto ai laboratori di fare l'analisi in doppio e di spedirci una lastrina, in modo da poter reinterpretare i risultati. Era anche richiesta l'interpretazione dei risultati con l'invio delle risposte con le stesse modalità utilizzate per i pazienti, per valutare se il laboratorio si adeguasse alle raccomandazioni internazionali.

Hanno aderito 28 laboratori che hanno utilizzato varie strumentazioni e metodi di rivelazione. Sono stati utilizzati 7 strumenti diversi, 43% utilizza anticorpo singolo ed il restante 57% doppio. Le risposte sono risultate esatte nel 93% dei casi per i campioni "facili" cioè i campioni 1 e 2 e nel 50% del campione 3 ("difficile"). Quando i risultati sono stati reinterpretati dagli arbitri, il campione 1 è risultato scorretto in un caso, il campione 2 in nessuno ed il campione 3 solo nel 39% dei casi. Il 29% dei partecipanti ha inviato referti conformi alle raccomandazioni internazionali.

I risultati di questo controllo di qualità sottolineano le buone prestazioni dei laboratori partecipanti. Le prestazioni possono tuttavia essere migliorate prestando maggiore attenzione all'interpretazione dei tracciati e nella qualità del referto analitico.

053

LE NON CONFORMITA' DI PROCESSO IN UN SISTEMA UNI EN ISO 9001:2000G. Cosio¹, M. Daves¹, M. Floreani¹, G. Petermeir¹, R. Nocker¹, F. Rizza¹¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria dell'Alto Adige, Comprensorio Sanitario di Bolzano

Scopi. Presentare il "percorso" intrapreso dal nostro Laboratorio certificato nella raccolta e valutazione delle "non conformità" (NC).

Metodi. Le NC vengono registrate dal personale della UO su un apposito modulo di registrazione. La "raccolta" dei moduli avviene al termine di ogni trimestre; alla raccolta segue l'elaborazione dei dati.

Risultati. L'elaborazione dei dati (NC di settore) inizialmente consisteva nella semplice "conta numerica" (somma delle NC di tutti i settori) e nella suddivisione per tipo delle stesse rappresentata con istogrammi. Il miglioramento consisteva nel valutare se il numero di NC diminuiva il trimestre successivo. Un grave errore, infatti una delle Minor NC assegnate dall'ente di certificazione (LLOYD'S) al nostro servizio durante la prima visita post-certificazione dichiarava: "le nc di processo sono state regolarmente registrate, tuttavia non è stato dato un peso di significatività che consenta di fare dettagliate valutazioni sulla criticità dei dati ottenuti".

Il superamento della Minor NC ha previsto la stesura di "linee guida" e la loro diffusione a tutto il personale. In particolare il personale della UO era tenuto a elaborare uno scritto contenente le seguenti informazioni: 1) registrare le NC nel modulo apposito, 2) numerarle progressivamente, 3) distinguere le NC tra interne ed esterne, 4) classificarle per tipo, 5) osservarle criticamente (le NC vanno "pesate") per evidenziare la necessità di Azioni Correttive (AC) o Preventive (AP); la richiesta di AC o AP viene rivolta al Responsabile della Qualità e portata alla attenzione del Primario.

Conclusioni. La richiesta di AC/AP nasce da chi opera sul campo (settori analitici): il personale deve essere formato e coinvolto nell'esigenza di individuare le cause di NC e di adottare azioni per evitare il ripetersi delle stesse.

Bibliografia

1. Plebani M., Bizzarri G. "I processi nel laboratorio clinico nell'ottica del sistema (ISO 9001:2000)", Francoangeli, 2004.

054

RUOLO DEGLI INDICATORI IN UN SISTEMA QUALITÀ UNI EN ISO 9001:2000G. Cosio¹, M. Daves¹, M. Floreani¹, G. Petermeir¹, R. Nocker¹, F. Rizza¹¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria dell'Alto Adige, Comprensorio Sanitario di Bolzano

Scopi. Presentare gli indicatori del Sistema Qualità (SGQ) UN EN ISO 9001:2000 della nostra UO.

Metodi. 1) attuare una raccolta di dati/informazioni per la misurazione ed il monitoraggio dei processi, 2) utilizzare tecniche statistiche, istogrammi che aiutano a interpretare, controllare la variabilità dei processi.

Risultati. In relazione ai dati raccolti, i "nostri" indicatori sono: A) indicatori in grado di monitorare i processi fondamentali della UO (fase preanalitica, analitica, postanalitica, approvvigionamento, formazione): 1)% urgenze con TAT > 2 ore, 2)% esami urgenti/totale esami interni, 3)% accettazioni urgenti/totale accettazioni interni 4) n° medio test urgenti per paziente interno, 5) n° medio test routine per paziente interno, 6)%campioni-provette non idonee, 7)% risultati al di fuori della soglia di accettabilità sul totale dei risultati di CQ-VEQ, 8)% test ripetuti, 9)% kit reattivi scaduti sul totale kit; B) indicatori in grado di monitorare specificatamente le performances dei diversi settori analitici della UO: 1)% di campioni medico-legali refertati entro 15 giorni dall'arrivo (farmacocinetica), 2)% campioni "accoppiati" sul totale campioni alle ore 10-12 (biochimica 1, biochimica 2, settore urine-ematologia-coagulazione, settore proteine), 3) % esami urgenti repertati entro 1½ ora (settorie urgenze), 4)% ripetizioni vetrini per IFI (autoimmunità), 5) ripetibilità "random" test FT3, FT4, TSH con valori entro range prestabiliti (immunochimica), 6) questionario di valutazione della soddisfazione del paziente esterno che si rivolge al centro prelievi (personale infermieristico), 7) % accettazioni pazienti del Laboratorio di Biochimica sul totale di accettazioni di tutti i laboratori del Dipartimento (segreteria).

Conclusioni. Gli indicatori vengono selezionati a scopo descrittivo o valutativo. Devono essere pertinenti, facili da rilevare e di utilità decisionale, supportando l'organizzazione nei processi di monitoraggio, misurazione, analisi e miglioramento.

Bibliografia

"Applicare la norma UNI EN ISO 9001:2000 nei servizi di medicina di laboratorio -smel-", Sistemi Qualità-Linee Guida 42, FISMELAB, Regione Lombardia- Sanità, 2002.

055

PROPOSTA DI UNA METODOLOGIA PER LA VALUTAZIONE E QUALIFICAZIONE DEI FORNITORI

I. Pascucci¹, T. Lupo¹, E. De Sisto¹, P. Carandente Giarrusso¹

¹Dipartimento Assistenziale di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II, Napoli

La Qualificazione dei Fornitori è finalizzata ad accertare se un Fornitore potenziale di prodotti (reagenti e strumentazioni)/servizi critici ha i requisiti idonei a renderlo Fornitore effettivo e a confermare in tale ruolo i Fornitori storici. Premesso che in tutti i processi di scelta deve ritenersi prioritaria la valutazione documentata, oltre che delle specifiche fornite dai Fornitori, della sperimentazione, dell'esperienza pregressa e della valutazione effettuata dal Laboratorio, la qualificazione deve essere effettuata in due momenti diversi: in fase preventiva ed in process.

È stata predisposta modulistica dedicata ove sono riportati gli elementi di valutazione in ordine di criticità, ai quali assegnare un punteggio da correggere per il "peso" predefinito. Gli elementi oggettivi di valutazione, sono stati così indicati:

per il prodotto: prove tecniche specifiche secondo i protocolli nazionali e internazionali, dati ottenuti in programmi di valutazione del CQI e di VEQ, riferimenti bibliografici, non conformità delle specifiche e della fornitura, numero fermi macchina/anno in relazione alla obsolescenza della strumentazione;

per il servizio: qualificazione dell'organizzazione, numerosità e tipologia dei servizi offerti, riferimenti bibliografici, capacità di far fronte a richieste urgenti, efficacia dell'intervento, efficacia della Hot-line, chiarezza ed esaustività della risposta, rispetto dei tempi di risposta definiti dallo stesso Fornitore, esperienze pregresse.

I giudizi contenuti nelle schede di valutazione, relativi a tutte le linee diagnostiche ed alle diverse linee di produzione dello stesso Fornitore, sono elaborati analiticamente e globalmente, al fine di confrontare i risultati e pervenire ad un giudizio obiettivo, comprensivo di tutte le variabili. L'Elenco dei Fornitori, con il grado di qualificazione, è redatto sulla base del punteggio ottenuto.

La metodologia proposta, attraverso la raccolta ed elaborazione dati, permette il monitoraggio dell'affidabilità del Fornitore e consente l'ottimizzazione delle risorse economiche destinate all'acquisizione di prodotti/servizi, sulla base di evidenze oggettive.

Bibliografia

1. M.R. Cavallo et alia "Il Laboratorio analisi nelle "ISO 9000" ed oltre: Guida pratica" ed. Biomedica Source Books

056

SCELTA DEGLI INDICATORI DI QUALITÀ IN UN CORSO DI STUDI UNIVERSITARIO POST-LAUREA

I. Pascucci¹, G. Conte², P. Cuccaro², A. della Vecchia², G. De Luca², A. Iacolare², P. Porcile², G. Rogliani², A. L. Russo², A. Russo², L. Sacchetti¹

¹Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche & CEINGE Biotecnologie Avanzate

²Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva Dir. Prof. M. Triassi Università degli Studi di Napoli "Federico II"

L'organizzazione di Corsi di Studio (CDS) universitari può considerarsi un'attività organizzata per processi nella quale la qualità della formazione va garantita non come adempimento discrezionale ma fine istituzionale.

Il presente lavoro propone una sperimentazione volta ad implementare "la ricerca di qualità" nella Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica, partendo dagli approcci ISO e dalla strategia del TQM, finalizzati all'ottenimento della certificazione.

Il modello di valutazione adottato è partito dalla scomposizione delle attività del CDS in quattro macroaree: Sistema organizzativo, Obiettivi formativi, Risorse, Strumenti di formazione, ricercando poi, in ciascuna di esse, le specifiche criticità alle quali applicare opportuni indicatori.

L'obiettivo di individuare i migliori indicatori possibili è stato soddisfatto somministrando questionari tematici di soddisfazione degli iscritti, allo scopo di evidenziare criticità suscettibili di interpretazione qualitativa (percezione individuale dell'efficacia del corso) in base alla specificità del CDS (ordinamento).

Sono state formulate per ogni macroarea domande chiuse con 4 possibilità di risposta e uno spazio libero per commenti aperti, la valutazione dei risultati ha tenuto conto del CDL di provenienza e dell'anno di corso.

Le criticità così emerse sono state tradotte in voci misurabili con indicatori.

La maggiore soddisfazione degli iscritti si è registrata nelle domande relative alla figura del tutor individuale ed alle attività di tipo innovativo (Seminari e Journal Club) a fini relazionali e formativi nonché ai seminari sull'applicazione delle norme in materia di privacy. Sono stati considerati critici: l'attività pratica e di tirocinio e l'efficacia della presenza del rappresentante degli Specializzandi durante le sedute del Consiglio della Scuola.

L'uso di un cruscotto di indicatori modulato sulla percezione dell'utenza del CDS sembra promettere una asintotica e crescente aderenza del sistema formativo alle esigenze dei suoi fruitori (iscritti), da verificare riproponendo lo stesso questionario, in seguito all'applicazione delle opportune Azioni Correttive.

Bibliografia

MIUR Com. naz. per la valutazione del sist. univ. VII Rapp. sullo Stato del Sistema Universitario- 10/2006

057

VEQ PER LA RICERCA DEL SANGUE OCCULTO NELLE FECIL. Zardo¹, L. Sciacovelli¹, S. Secchiero¹, M. Plebani¹¹Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco V.to, Treviso

La ricerca del Sangue Occulto Fecale (Sof) è stata scelta come test di screening di primo livello per i tumori del colon retto con l'obiettivo di identificare precocemente le forme tumorali invasive e possibili precursori. Il Centro di Ricerca Biomedica, che dal 1985 gestisce programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ), nel 2006 ha implementato un programma per il Sof, in linea con le raccomandazioni del Ministero della Salute che sottolineano l'importanza per i laboratori di screening di partecipare a cicli di VEQ. Il programma prevede l'invio di 6 campioni in forma liofila a diverse concentrazioni di Emoglobina. Obiettivo di questo lavoro è presentare i risultati ottenuti nel ciclo 2006 fornendo una fotografia del livello di standardizzazione esistente fra i laboratori italiani. Hanno partecipato 75 Laboratori (17 sono laboratori di screening), dei quali 44 utilizzano un sistema di analisi qualitativo (CARD) e 31 un sistema quantitativo. Tra i laboratori che utilizzano sistemi quantitativi solo il 77% usa un cut-off pari a 100 ng/mL come raccomandato dalla letteratura. Relativamente alle Card si è rilevata discrepanza fra il limite di rivelazione dichiarato dal produttore e le concentrazioni di emoglobina realmente rilevate. I risultati del ciclo 2006 hanno evidenziato una concordanza fra i laboratori, nella classificazione del campione, pari al 100% per campioni nettamente negativi (15 ng/mL) e pari all'88-98% per campioni nettamente positivi (>170 ng/mL). Per concentrazioni intorno al cut-off la concordanza è stata minore: il 60% dei laboratori ha identificato come negativo un campione di 80 ng/mL e il 79% come positivo un campione di 120 ng/mL. I dati evidenziano che un'errata classificazione del campione risente sia della variabilità analitica che del cut-off scelto dal laboratorio. Per migliorare la concordanza nella ricerca del Sof è necessario quindi migliorare la precisione e l'accuratezza delle tecniche attualmente disponibili ma è altrettanto urgente che i professionisti di laboratorio adottino dei valori di cut-off in linea con le raccomandazioni esistenti. I Programmi di VEQ in questo caso possono svolgere un ruolo di mediazione fra le organizzazioni scientifiche ed i laboratori facilitando la diffusione delle raccomandazioni.

058

UN ESEMPIO DI SISTEMA INFORMATIZZATO PER LA GESTIONE DEL CONTROLLO DI QUALITÀ NEL SETTORE DI MICROBIOLOGIAN. Venturi¹, M. Solaro¹, E. Galbiati¹, F. Pozzi¹, M. Beretta¹, F. Sciarini¹, V. Proserpio¹, L. Colombo¹, R. Cecere¹¹Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio Ospedale di Desio

Il Controllo di Qualità dei test eseguiti nei Laboratori di Analisi Cliniche richiede la messa a punto di procedure che consentano la verifica dell'iter diagnostico nel suo complesso e quindi la gestione di una notevole quantità di dati. Nel laboratorio analisi dell'Ospedale di Desio è stato realizzato un servizio, il Portale della Qualità (PdQ), per la gestione informatizzata del Controllo di Qualità.

Scopo di questo lavoro è stata la creazione di una nuova sottosezione del PdQ per la gestione dei programmi di controllo di qualità interni del settore di microbiologia (33 parametri, con diversa frequenza di esecuzione). Il risultato dei test eseguiti in microbiologia è generalmente di tipo qualitativo (Positivo/Negativo) e quindi, a differenza della maggior parte dei test di laboratorio, non è possibile applicare le carte di controllo e gli algoritmi di Westgard. Questo ha reso necessaria la realizzazione di un sistema specifico sia per l'inserimento che per la visualizzazione dei dati dei controlli di qualità. Entrambe le procedure si effettuano accedendo al PdQ alla sottosezione del Controllo di Qualità del settore di microbiologia. Sono previste diverse opzioni di scelta che individuano la tipologia di controllo. Ogni opzione presenta un elenco dei programmi registrabili. L'operatore deve solo inserire, con un sistema codificato, il risultato ottenuto per ciascun parametro.

Il sistema di visualizzazione grafica riporta un calendario mensile che riassume l'esito della sessione di controllo per ogni antibiotico, identificando con diverso colore le situazioni di fuori controllo da quelle di accettabilità. Inoltre è possibile visualizzare in dettaglio i risultati di ogni sessione e le eventuali azioni correttive messe in atto.

Mentre la registrazione dei controlli fino ad oggi veniva eseguita quasi esclusivamente su carta, attualmente sono stati inseriti nel PdQ 31 dei 33 (93.9%) controlli di qualità eseguiti in microbiologia.

La modalità di registrazione per i due ancora mancanti è in fase di studio.

Il principale vantaggio del nuovo sistema è di rendere più semplice e immediata l'interpretazione e la valutazione complessiva dei risultati dei controlli.

Il controllo di qualità interno nel laboratorio clinico. Regione Lombardia. 2000.

059

IL PORTALE DELLA QUALITÀ PER IL MIGLIORAMENTO DI UN SERVIZIO DI MEDICINA DI LABORATORIO

R. Cecere¹, M. Solaro¹, F. Pozzi¹, E. Galbiati¹, A. Sala¹, P. Brambilla¹, P. Mocarrelli¹

¹Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Desio, Desio, Milano

L'aumento del numero di test eseguiti nei Laboratori di Analisi Cliniche e dei relativi controlli di qualità ha portato a dover gestire contemporaneamente una gran quantità di dati. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di progettare un servizio informatico, il Portale della Qualità (PdQ), che permetta di visualizzare, in parallelo e in tempo reale, tutti i dati dei controlli di qualità interni (CQI) eseguiti nel laboratorio analisi dell'Ospedale di Desio (588 sieri di controllo per 312 analiti, verificati con una periodicità da giornaliera a settimanale), i dati relativi alla manutenzione degli analizzatori e alle non conformità.

Il PdQ è stato realizzato da personale tecnico informatico interno al laboratorio, utilizzando i linguaggi specifici per i documenti ipertestuali del World Wide Web. Il PdQ è costituito da tre sezioni principali: Controllo di Qualità (gestione dei risultati dei CQI), Manutenzione (registrazione e visualizzazione dei dati relativi alla manutenzione strumentale) e Non Conformità (registrazione, archiviazione e distribuzione dei rapporti sugli eventi non conformi).

È stato informatizzato il 48% (149 su 312) dei programmi di CQI eseguiti nel laboratorio. La sezione presenta diversi tipi di carte di controllo, tabelle di riepilogo dati, statistiche e grafici di tendenza.

La sezione "Manutenzione", attiva per 33 analizzatori del laboratorio, si compone di tre parti: registrazione, consultazione dei report di manutenzione ed impostazione delle azioni di manutenzione associate al periodo di effettuazione.

La sezione "Non conformità" è suddivisa in tre parti: segnalazione, gestione ed elaborazione statistica dei rapporti di non conformità. Tali rapporti vengono scambiati elettronicamente tra il referente della qualità e i responsabili di settore in modo da individuare le azioni correttive più appropriate e valutarne l'efficacia.

La fase iniziale di questo progetto ha evidenziato numerosi vantaggi, quali l'estrema maneggevolezza, l'utilizzo e la condivisione di un gran numero di informazioni in rete, l'immediatezza di comunicazione e la possibilità di effettuare interventi in tempo reale.

Bibliografia

1. Plebani M. Sistema qualità ed accreditamento nel laboratorio clinico. Biomedica Source Books;1998;vol.6.

060

EVOLUZIONE DEGLI ERRORI DI LABORATORIO ED ANALISI RETROSPETTIVA DEL RISCHIO

R. Marozzi¹, G. Carusillo¹

¹A.O. Chiari, Laboratorio Analisi P.O. di Iseo, Brescia

L'errore è elemento ineliminabile in ogni processo con uomini ed apparecchiature. In sanità la probabilità non è annullabile, è un rischio per il paziente e nei casi più gravi produce un danno grave e permanente.

Il laboratorio deve conoscere e valutare i suoi errori, la probabilità ed i rischi, in particolare se l'organizzazione è gestita con un sistema di gestione qualità. Si è proceduto ad una rivalutazione delle non conformità registrate dal 2001 al primo quadrimestre del 2007, per tutte le richieste di prestazioni.

Sono state elaborate le non conformità preanalitiche dei campioni (emolisi, mancanza, ecc.) e le postanalitiche causate dal laboratorio (errori di refertazione, consegna, ecc.), fasi nelle quali è noto verificarsi il maggior numero di errori. Sono presentati gli elaborati dai quali è possibile ricavare varie indicazioni.

Le non conformità a carico dei campioni mostrano una prevalenza costante della mancata consegna (89%), in particolare dei materiali la cui raccolta (anche in reparto) è spesso demandata al paziente (urine, ecc.) o provenienti da reparti particolari (pediatrici, ecc.).

Dopo l'informatizzazione delle richieste si nota la comparsa e la crescita della non conformità di mancata consegna di tutti i materiali di prelievo.

L'elaborazione degli errori di refertazione mostra una diminuzione della loro incidenza in coincidenza di eventi significativi per la gestione del laboratorio: l'implementazione del sistema di gestione qualità (da 0,085 a 0,033%), l'informatizzazione di tutte le fasi di gestione delle richieste urgenti (0,017), il collegamento con i reparti per l'inserimento delle richieste (0,008).

Esaminando gli errori residui essi sono quasi totalmente dovuti a gestioni manuali dei risultati; inoltre gli errori di refertazione del dato analitico in genere sono rilevati in situazioni di manifesta incongruenza con i dati clinici. Da ciò consegue che il laboratorio deve perseguire l'automazione di tutte le fasi di lavoro, per poter controllare i processi ed evitare gli errori, in particolare quelli che per le loro caratteristiche possono essere plausibili con lo stato clinico del paziente.

Bibliografia

Plebani M, Carraro C. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem* 1997;43:1348-1351.

061

VERIFICA DELLA QUALITA' PERCEPITA: ANALISI DELLE SEGNALAZIONI DAGLI UTENTI AMBULATORIALIS. Gelsumini¹, L. Sciacovelli², S. Altinier¹, M. Plebani¹¹*Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Università di Padova*²*Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto, Treviso*

La verifica della qualità percepita dagli utenti ambulatoriali, è uno strumento cardine per valutare l'efficacia del sistema organizzativo.

Scopo di questo lavoro, è analizzare le segnalazioni formalizzate spontaneamente dagli utenti dell'ambulatorio utilizzando un modulo appositamente predisposto riportante: 11 domande a risposta chiusa, relative ai requisiti da monitorare; una domanda aperta, per raccogliere un giudizio generale ed eventuali suggerimenti di miglioramento.

I risultati relativi alle risposte chiuse, (N=213 da 178 moduli) raccolti da maggio 2005 a maggio 2006, dimostrano che:

- il numero delle segnalazioni è in diminuzione;
- il grado di soddisfazione dell'utenza risulta migliorato su tutti gli aspetti considerati, ad eccezione di quello relativo alla cortesia del personale addetto al prelievo.

Si evidenzia la necessità di indagare le motivazioni che hanno spinto alcuni utenti (2006: 2 su 52; 2007: 3 su 14) a segnalare una mancanza di cortesia da parte del personale addetto al prelievo, valutarne la fondatezza ed intraprendere le opportune azioni correttive.

E' noto che il paziente/utente non possa giudicare la qualità del servizio da un punto di vista tecnico-professionale, è invece certo che possa esprimere un giudizio sugli elementi organizzativi, non meno importanti. L'analisi delle segnalazioni dei pazienti permette di verificare i risultati ottenuti in relazione alle attese, di capire le potenzialità di avvicinamento tra domanda ed offerta ed attuare le opportune azioni di miglioramento, per mantenere elevato il grado di soddisfazione.

062

RICERCA DELLA PROTEINURIA DI BENCE JONES AI FINI DEGLI ESAMI CONTRASTOGRAFICI. ESPERIENZA DI UN LABORATORIOT. Lupo¹, I. Pascucci¹, E. Caracciolo¹, L. Pappalardo²¹*Dip. Ass. di Medicina di Laboratorio Azienda Ospedaliera Universitaria "Federicoll" Università degli Studi di Napoli*²*Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica Università degli Studi di Napoli*

La ricerca della Proteina di Bence Jones (BJ) è indicata in soggetti con:

- componente monoclonale (CM) sierica
- sospetto di mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldstrom, amiloidosi, malattie di catene leggere e altre condizioni correlate.

Tale indagine è, inoltre, intesa come propedeutica ad esami contrastografici

Obiettivo del lavoro è stato verificare l'appropriatezza delle richieste.

Abbiamo esaminato n.810 richieste di un mese campione correlando i risultati ai valori di Creatinina ed Urea sieriche, laddove disponibili.

Dai dati dello screening nefelometrico è risultato che:

Il 66.2% (536) dei campioni presentava valori di κ e λ compresi nell'intervallo di riferimento ed il 90% (483) di questi presentava valori di Creatinina ed Urea nell'intervallo di riferimento;

il 26.7% (216) presentava valori elevati di κ e λ ma inferiori al valore della proteinuria, di questi il 73% (158) con valori di Creatinina ed Urea nell'intervallo di riferimento;

il 7.1% (58) presentava valori di κ e λ elevati e/o rapporto κ/λ patologico, per cui necessitava di approfondimento.

Non sono stati sottoposti ad immunofissazione n.28 cp, in quanto le IgG urinarie risultavano anch'esse alterate, tale concordanza è indicatore di catene leggere policlonali e/o di CM completa, si escludeva, pertanto, la presenza di BJ. Per n.30 cp è stata effettuata l'immunofissazione e, di questi, soltanto n.13 sono risultati positivi, n.12 con CM presente nel siero (pz sui quali la determinazione viene effettuata di routine) e n.1 con proteinuria elevata e valori di creatinina ed urea patologici.

Nel 98% dei casi, pertanto, la BJ risultava negativa ed i pz potevano essere sottoposti ad esami contrastografici.

Nella valutazione dei costi è risultato che il costo totale dei reagenti utilizzati è stato pari a circa 6400€, con un costo di circa 6200€ per i dosaggi risultati negativi.

Una preventiva valutazione della funzionalità renale (creatinina, urea, elettroforesi delle proteine sieriche), integrata, ove il caso, con il dosaggio delle proteine urinarie totali, porterebbe ad una migliore gestione delle risorse, le suddette indagini, infatti, rientrano nel pannello richiesto al momento del ricovero.

Bibliografia

G.P. Feltrin et al. Radiol. Med 107-2004

063

THE PANCREATIC CANCER DERIVED N-TERMINAL PEPTIDE OF S100A8 INHIBITS INSULIN EXOCYTOSIS AND STIMULATES CANCER CELL GROWTH

A. Padoan¹, E. Greco¹, D. Basso¹, P. Fogar², A. Valerio³, E. Fadi¹, S. Schiavon¹, M. Fasolo¹, S. Vigolo³, E. De Carlo³, A. Stranges¹, F. Navaglia¹, C. Zambon², S. Pedrazzoli², M. Plebani¹

¹Department of Laboratory Medicine, University of Padova, Italy

²Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padova, Italy

³Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Padova, Italy

Introduction. We hypothesized that the 14 aminoacid N-terminal peptide of S100A8 (NT-S100A8), isolated by us from cancer tissues of diabetic patients, might cause diabetes mellitus by interfering with insulin secretion and/or signalling.

Methods. β TC6 (rat insulinoma), HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and Capan1 (human pancreatic carcinoma) cell lines were used. Control, Capan1 conditioned or 50 nM NT-S100A8 added β TC6 cells were stimulated to release insulin by hyperglycemia. HepG2 cells were cultured in the presence or absence of insulin (50 mU/mL) and treated with increasing amounts of NT-S100A8 (from 25 to 500 nM). They were counted after 24, 48 and 72 hrs.

Results. Hyperglycemia induced a significant early (3-60 minutes) and late (24 hrs) insulin release from β TC6 cells. In the presence of NT-S100A8 insulin exocytosis from secretory vesicles (3-60 min release), was significantly reduced (Repeated measures analysis of variance: $F=4.02$, $p<0.05$). Insulin stimulated HepG2 cell growth. In insulin non stimulated cells NT-S100A8 at 500 nM significantly enhanced cell growth ($F=2.71$, $p<0.05$). This stimulatory effect was more pronounced in insulin treated cells ($F=3.6$, $p<0.005$).

In conclusion. The NT-S100A8 inhibits glucose stimulated insulin exocytosis (early response); this finding supports the hypothesis that this pancreatic tumor derived peptide alters β -cell insulin secretion. We choose the hepatocellular carcinoma cell line HepG2 to test insulin signalling events, since in this line the activation of the insulin receptor evokes the mitogenic signalling through MAPK phosphorylation and activation. The NT-S100A8 at a 10 fold higher dosage (500 nM) than that able to inhibit insulin release, was shown to be a growth factor for HepG2 cells, being this effect synergic with that of insulin.

064

UTILITÀ DI REFERTARE LA PRESENZA DI HBA2 AUMENTATA IN RICHIESTE DI EMOGLOBINA GLICATA

G. Previtali¹, M. Amadei¹, G. Bergamaschi¹, M. Donati¹, M. Frasanni¹

¹Lab. Analisi U.O. Patologia Clinica AUSL di Parma

Obiettivo della ricerca. Lo stato eterozigote della beta-talassemia è una condizione asintomatica determinata da uno stato di eterozigosi per il gene della beta-0 o beta+ - talassemia. I portatori di questo tratto talassemico sono totalmente asintomatici dal punto di vista clinico, tuttavia il riconoscimento di questi individui è molto importante nella profilassi eugenetica della talassemia. L'introduzione di tecnologie come l'HPLC ha permesso di eseguire contemporaneamente la determinazione dell'emoglobina-glicata (HbA1c) e dell'emoglobina A2 caratteristica del tratto talassemico. Obiettivo della ricerca è stato quello di identificare pazienti con richiesta HbA1c e portatori sconosciuti di tratto-talassemico.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati i campioni di sangue intero di 7744 pazienti con richiesta di HbA1c. Il metodo utilizzato è stato l'HPLC con strumento ADAMS HA-8160 distribuito dalla Ditta Menarini.

Risultati. Sono stati evidenziati 92 pazienti con tratto talassemico (1.2% del totale).

Di questi 61 (66%) aveva un valore medio di HbA1c del 10,7% (6.5-14.8%) ed anni 69.5 (35-96); 12 (13%) - HbA1c 6.2% (6.0-6.4%) anni 67.5 (35-87); 19 (21%) - HbA1c 4.8% (3.7-5.95) anni 37 (8-82)

Conclusioni. Dei 92 pazienti con tratto talassemico sconosciuto 5 donne erano in età fertile (20-35 anni), un ragazzo di 8 anni e 8 uomini di età compresa fra i 47 e i 58 anni. Questo dimostra l'utilità di una refertazione che evidenzia qualora riscontrata la presenza di una aumentata HbA2. Inoltre la presenza del 66% dei pazienti con HbA2 alta e una HbA1c mediamente del 10.7% pone il problema se il tratto talassemico costituisca un fattore predisponente per il diabete.

Bibliografia

Le talassemie: un problema medico-sociale ieri e oggi. Ida Bianco Silvestroni COLLANA STUDI E RICERCHE.

065

RELATIONSHIP BETWEEN MEAN PLATELET VOLUME AND BIOCHEMICAL COMPONENTS OF THE METABOLIC SYNDROMEG. Lippi¹, G. L. Salvagno¹, M. Montagnana¹, G. Targher², M. Franchini³, G. C. Guidi¹¹Sez. Chimica Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona²Sez. Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Università di Verona³Ser. di Immunoematologia e Trasfusione, Az. Ospedaliera di Verona

Background. Platelet activation and aggregation are central processes in the pathophysiology of cardiovascular disease. The mean platelet volume (MPV), a determinant of platelet activation, is a newly emerging risk marker for atherothrombosis. It has been reported that the MPV patients with metabolic syndrome (MS) have higher MPV compared to control subjects.

Methods. To test this hypothesis, we performed a retrospective analysis on the database of the Laboratory Information System of the Clinical Chemistry Laboratory at the University Hospital of Verona to retrieve results of MPV, and the three key components of the MS according to the ATP III criteria (fasting plasma glucose, FPG, high density lipoprotein-cholesterol, HDL-Cholesterol, and triglycerides) which have been performed on all outpatients consecutively referred by the general practitioners for routine blood testing in the last 2 years (May 2005-May 2007).

Results. Cumulative results for MPV, FPG, HDL-cholesterol and triglycerides were retrieved for 3,337 outpatients >35 years old over the 2-years period. 97 subjects (2.9%) had values of all the three biochemical parameters suggestive for the diagnosis of MS according to the ATP III criteria. The mean MPV of subjects with values of all the biochemical markers suggestive for MS was slightly higher but not significantly different from that of subjects with values below the above specified thresholds (8.7 fl, 95% CI: 7.7 to 9.6 fl versus 8.6 fl, 95% CI 7.5 to 9.6 fl, p=0.119).

Conclusions. Results of this large retrospective analysis attest that the MPV of patients with biochemical markers suggestive for MS might not be significantly different from that of the control population.

066

STUDIO RETROSPETTIVO DELLA NEFROPATIA DIABETICA: RUOLO DI ALBUMINURIA, CISTATINA C E PARAMETRI ECOGRAFICIM. Floreani¹, A. Casadei², G. Cosio¹, M. Daves¹, M. Marchesi², F. Rizza¹¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Comprensorio Sanitario di Bolzano²Divisione di 1° medicina, Comprensorio Sanitario di Bolzano

Scopo. Una popolazione di pazienti con diabete mellito tipo 2 (NIDDM), studiata nel 1998, è stata rivalutata a distanza di 7 anni per individuare parametri prognostici laboratoristici e ecografici indirizzati ad una eventuale evoluzione della nefropatia diabetica (ND).

Materiali e metodi. Popolazione: 120 pazienti NIDDM. Nello studio iniziale sono stati valutati: creatinina, albuminuria, cistatina C, l'indice di resistenza (RI) ed eco-color-Doppler degli arti inferiori. Nessun paziente era affetto da ND. Dopo 7 anni la popolazione è stata suddivisa in 2 gruppi in relazione allo sviluppo o meno della ND: gruppo 1 (gr.1), n=31, creatinina >1,4 mg/dl e gruppo 2 (gr.2), n=89, creatinina <1,4 mg/dl.

Risultati. L'albuminuria ha, nei confronti della ND, valore predittivo negativo 88%, sensibilità diagnostica 77,8% e specificità 47,3%. I pazienti con albuminuria patologica hanno una stima di rischio, per ND, di 3,1 (intervallo di confidenza al 95%: 1,2-8,5) e per arteriopatia di 5,9 (2,2-15,6). Il gr.1 presentava valori di albuminuria di 723±1041 mg/24h significativamente differenti da quelli del gr.2 (239±537 mg/24h).

La cistatina C ha una sensibilità diagnostica 30% superiore a quella della creatinina. La specificità della cistatina C nei confronti della ND è del 92,5%.

Segnaliamo un valore predittivo negativo dell'RI nei confronti della ND di 85,7%, una sensibilità diagnostica di 70,4% e una specificità di 51,6%. I pazienti con RI >0,7 hanno una stima di rischio, per la ND, di 2,5 (1,01-6,36) e per l'arteriopatia di 5,6 (2,2-14,7).

Conclusioni. L'albuminuria si conferma parametro utile nella stima di rischio sia nella ND che nella malattia cardiovascolare, mentre per quanto riguarda la cistatina C risulta avere una sensibilità diagnostica nei confronti della ND nettamente superiore alla creatinina.

L'RI fornisce dati importanti per la valutazione prognostica della ND, inoltre permette una valutazione della stima di rischio per lo sviluppo di malattia cardiovascolare.

Bibliografia

Nosadini R., Velussi M. et al. Increased renal Arterial Resistance Predicts the Course of Renal Function in T2pe 2 Diabetes With Microalbuminuria. *Diabetes*; Vol. 55, January 2006.

067

VALUTAZIONE DI UN NUOVO METODO DIRETTO IN TOTALE AUTOMAZIONE DELLA EMOGLOBINA A1C

M. Tagliazucchi¹, A. Fortuna¹, W. Tizzanini¹, C. Bitella¹, R. Sansottera¹, A. Carbonieri¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Modena

²Sentinel Diagnostics

Premessa. La determinazione dell'emoglobina A1c (HbA1c) è impiegata come indicatore oggettivo del controllo a lungo termine dei livelli del glucosio nel sangue. L'aumentata incidenza del diabete nella popolazione e i fenomeni riorganizzativi delle strutture sanitarie hanno creato l'esigenza di disporre di tecnologie atte a migliorare la produttività del laboratorio analisi.

Obiettivi. Valutare le prestazioni di base di un metodo proposto da Sentinel Diagnostics (Milano, Italia) per la determinazione dell'HbA1c su strumentazione di chimica clinica ad elevata automazione.

Metodologia. Questo innovativo metodo, che è stato sperimentato sul Modular Roche presente nel nostro laboratorio in comparazione con l'HPLC HA8160 A.Menarini (Italia), consente di operare con i campioni di sangue intero e di ottenere direttamente il risultato in HbA1c% senza la necessità di misurare separatamente l'HbT, HbA1c e successivamente calcolarne la percentuale.

Il principio di determinazione si basa su una reazione antigene – anticorpo rilevata con metodo turbidimetrico e misurata attraverso una curva di taratura su 5 punti.

Risultati. Sono stati testati in doppio circa un centinaio campioni. Il metodo valutato ha mostrato una buona accuratezza rispetto al metodo in HPLC, $y=1.0346x+0.1218$ $r=0.9613$ ed una adeguata precisione con CV generalmente inferiori al 3% e quindi paragonabili con il metodo di riferimento.

Conclusioni. La valutazione effettuata ha confermato la validità del metodo sotto il profilo analitico e ha evidenziato vantaggi pratici che lo rendono adatto alle nuove esigenze organizzative del laboratorio.

Bibliografia

American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (Position Statement). Diabetes Care 24(Suppl.1):S33-S55, 2001).

068

GLUCOKINASE GENE MUTATIONS IN MODY2 PATIENTS FROM SOUTH ITALY

N. Tinto¹, A. Zagari², M. Capuano¹, A. De Simone², V. Capobianco¹, G. Daniele¹, M. Giugliano³, R. Spadaro³, A. Franzese³, L. Sacchetti¹

¹Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II" and CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

²Dipartimento delle Scienze Biologiche, Università di Napoli "Federico II" and CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

³Dipartimento di Pediatria, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italia

Maturity onset diabetes of the young (MODY) is a genetically and clinically heterogeneous form of diabetes mellitus characterized by an early onset age, a primary defect in beta-cell function and an autosomal dominant inheritance. Among the 6 known forms of MODY diabetes, the MODY2 form is induced by mutations in the glucokinase (GCK) gene. About 200 GCK mutations have been reported, and the frequency is higher in European Caucasians, particularly those from France and Italy. We screened the GCK gene by direct sequencing in 30 patients from south Italy with a clinical presentation suggestive of MODY2. Twelve mutations were detected in 16/30 patients; 9/12 were novel: 7 missense mutations, 1 nonsense mutation and 1 deletion. They were present in the patient's mother or father, co-segregated with the diabetic phenotype and were absent from 200 normal chromosomes. Using molecular modelling of the crystal structure of the enzyme, we examined the alterations induced by mutations in the protein. The study provided evidence for structural perturbations of the protein, thereby supporting the MODY2-causing nature of the mutations. It also highlighted 3D clustering. In fact, among the GCK variants detected in our population, 7/12 (~59%), 4/12 (33%) and 1/12 (8%) were localized in the small domain, in the large domain and in the connecting loops, respectively. This contrasts with previous studies of MODY2 mutations (41%, 58% and 1% respectively in the small domain, large domain and in the connection region) in Caucasian European and other ethnic groups. It is conceivable that the GCK small domain could represent a hot spot region for typical south Italy mutations. A high prevalence of the MODY2 form (53%) of MODY detected in Italian patients indicates that the molecular approach is useful because it allows one both to confirm the diagnosis of and to predict the likely or unfavourable prognosis and the clinical course of the patient.

069

NOVEL MUTATIONS IN MITOCHONDRIAL GENOME IN MIDD PATIENTS FROM SOUTHERN ITALYR. Liguori¹, C. Mazzaccara¹, M. Ferrigno¹, F. Prisco², D. Iafusco², P. Passaro², L. Sacchetti¹¹Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II" and CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia²Dipartimento di Pediatria, Seconda Università di Napoli, Italia

Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) cause a group of diseases with a phenotypic variation ranging from severe childhood multiorgan failure to adult-onset non-syndromic diseases. Maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) is a genetic disorder characterized by such common clinical features as neurosensory hearing loss, normal or low body mass index, short stature and macular dystrophy, and is caused by a mutation in mtDNA. Mutations in mitochondrial genes can disrupt ATP production and thereby impair glucose-induced insulin secretion. Several mutations in different regions of mtDNA were found in MIDD patients, the most frequent (0.5-2.5 of MIDD) being a point mutation transition at nt 3243 A>G in the tRNA leu (UUR) gene.

We looked for diabetogenic anomalies in the mtDNA of 15 patients with MIDD suspected on the basis of maternally inherited diabetes, and/or hearing loss and/or macular dystrophy. We screened the complete sequence of mitochondrial genome, extracted from the blood and buccal mucosa of the MIDD patients and their mothers. Sequence analysis was carried out using long-PCR of two mtDNA fragments. We detected 57 variations in MIDD mtDNA (4 heteroplasmic and 53 homoplasmic). Heteroplasmic mutations occurred in the hypervariable D loop, and in the mt-tRNA leu (3243 A>G in one patient), in mt-CO3 and mt-ND4 genes. 42.1% and 14.0% of all mutations occurred respectively in the complex I and complex IV of the respiratory chain. Twenty-one of these variations were novel. No mutations were found in healthy controls (n=10) and in 10 patients affected by diabetes I. Studies to establish the structural/functional importance and clinical significance of these variants are currently in progress.

070

VALORI DI RIFERIMENTO DELLE VARIABILI EMATOLOGICHE IN UNA POPOLAZIONE FEMMINILE IN GRAVIDANZAA. Cappellani¹, F. M. Biella¹, E. La Valle¹, G. Limonta¹, P. Tramacere¹, P. Brambilla¹, P. Mocarrelli¹¹Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio Ospedale di Desio, Desio, Milano

Introduzione. Le variabili emocromocitometriche, di grande rilievo nella diagnostica ematologica, subiscono delle variazioni nel corso della gravidanza. Allo scopo di definire i valori di riferimento nelle donne gravide sono stati analizzati i dati dell'archivio informatico del nostro laboratorio relativi agli esami eseguiti tra il 1990 e il 2007. Materiali e metodi. Le misurazioni degli analiti sono state eseguite con i contaglobuli automatici ADVIA 120-Bayer (1990-2006) e XE 2100-Dasit (2006-2007). Sono state selezionate consecutivamente le donne afferenti al laboratorio che avevano eseguito un esame emocromocitometrico di controllo durante la gestazione escludendo quelle con alterazione degli indici infiammatori, della funzionalità renale e della glicemia.

Risultati. La popolazione in studio, costituita da 18447 donne gravide di età compresa fra i 20 e i 39 anni, è stata suddivisa in base al trimestre di gravidanza ed è stata confrontata con un gruppo di controllo di età corrispondente.

E' stato evidenziato un decremento delle variabili RBC, HB e HT (i valori medi di HB diminuiscono progressivamente dal primo al terzo trimestre: 12.9±1.0ds, 12.0±1.0, 11.5±1.0) rispetto ai valori del gruppo di controllo (13.1±0.3ds) attribuibile al fenomeno di progressiva emodiluizione che caratterizza la gravidanza.

L'MCV mostra un lieve aumento rispetto ai valori basali di 87,8±4.4ds (valori medi nei trimestri: 86.5±6.0, 87.1±5.9, 87.9±6.1). Si rileva inoltre una tendenza all'aumento del valore WBC (8.0±1.9ds, 8.9±2.0, 9.9±2.4), dovuto all'incremento della frazione neutrofila (63.0±8.1, 63.3±6.9, 69.6±6.1), rispetto al gruppo di controllo dove il valore medio dei leucociti è di 7,0±1.9ds con una percentuale di neutrofili di 55.4±9.3.

Conclusioni. Durante i diversi trimestri della gravidanza sono state riscontrate delle variazioni nei valori di riferimento ematologici rispetto alle condizioni basali che sono concordi con quanto riportato in letteratura.

Bibliografia

Gronoswki A. Handbook of clinical laboratory testing during pregnancy. New York: Humana Press, 2004.

071

IMMUNE RECONSTITUTION OF THE T-CELL COMPARTMENT IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES FOLLOWING ALLOGENEIC NON MYELOABLATIVE HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION

C. Sfiligoi¹, S. Cena¹, P. Omedè¹, M. Spagnolo¹, M. Gilestro¹, F. Ferro¹, M. Ruggeri¹, S. Caltagirone¹, C. Di Bello¹, L. Giaccone¹, F. Fiore¹, L. Cimolin¹, A. Fantauzzo¹, M. Boccadoro¹, B. Bruno¹

¹Div. Universitaria di Ematologia, Az. Osp. S. Giovanni Battista, Torino

Allografting (HSCT) is a potentially curative therapy for a variety of hematological malignancies. Reduced-intensity/non-myeloablative conditionings were designed to initially establish hematopoietic mixed-chimerism and then to serve as a platform for additional cell immunotherapy aimed at eradicating tumor cells in medically unfit or elderly patients (up to 70 yrs). However, the risk of post-transplant infections and the efficacy of graft-versus-tumor effects also rely on thymic function. For this reason it is mandatory to evaluate post-grafting thymic function.

Signal joint T-cell receptor excision circles (sjTRECs) are stable extrachromosomal DNA fragments generated through the recombination of gene segments encoding the variable parts of the TCR. sjTRECs quantification in peripheral blood is currently considered the most reliable tool to assess thymic activity (Douek et al).

The immune recovery of the T-cell compartment was evaluated by flow cytometry and by TREC real time PCR analysis in 66 patients.

Peripheral CD4+ T-cells to >200/ μ l promptly recovered by day +28, gradually increasing at 1, 3 and 6 yrs. Naive CD4+CD45RA^{bright} T-cells increased at day +28, and at 2, 6 yrs. Memory CD4+CD45RO^{bright} remained stable from day +28 through month +3, then increased at 1, 2, 6 yrs.

TREC copies/100ng DNA from peripheral mononuclear cells (PBMC) and sorted CD4 cells were measured in 51 and 46 patients: median baseline value from PBMC was 0.7, then it increased 5 fold at 1 yr, 20 fold at 3 yrs and 75 fold at 5 yrs.

Median TREC copies/100ng DNA in CD4+ cells was 5 at 3 months, increased 7 fold at 1 yr and 15 fold at 5 yrs.

A significant correlation was demonstrated between TREC values from PBMC and CD4+CD62L+CD45RA^{bright} T-cells ($p < 0.00003$). In a subset of 35 patients the presence of naive T-cells and of memory T-cells was evaluated. Preliminary data showed an increase of these cell populations at 4 yrs, while they remained stable at 5 and 6 yrs.

Our findings suggest a slow T immune reconstitution during the first two years post-transplant and a significant correlation between quantitative analysis of TRECs and very naive CD62L T-cells.

References

1. Douek DC et al., Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection, *Nature* 1998;396:690-695.

072

VALORE PREDITTIVO DELL'ALLARME 'ERITROBLASTI' SU EMOCITOMETRO NON DEDICATO IN POPOLAZIONE A RISCHIO MEDIO-BASSO

D. Frattolillo¹, G. Testino¹, N. De Luca¹, C. Canali¹, M. V. Ciarla¹, R. Strom¹

¹Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Sez. Biochimica Clinica, Università "La Sapienza", Roma

Scopo. Verifica del valore predittivo dell'allarme 'Eritroblasti' su emocitometro Coulter GenS (CG) e analisi dei fattori interferenti.

Metodi. Tra 3286 emocromi eseguiti su CG (SVP in K3-EDTA) quelli con allarme NRBC (n=100) sono stati analizzati in citofluorimetria con propidio ioduro su Abbott Cell Dyn 4000 (AC) ed è stata fatta la conta degli eritroblasti (EB) su striscio colorato con May-Grumwald-Giemsa.

Risultati L'incidenza dell'allarme NRBC è 3%. Allo striscio in 16 casi erano presenti EB (0,3-4/100 WBC). Non è mai comparso l'allarme NRBC su AC; è comparso l'allarme FP ("Popolazione fluorescente") in 5 casi con EB su vetrino e in 1 caso negativo ($p < 0.01$). Nello scatterplot (SP) del CG le cellule non-WBC si disponevano sotto i linfociti secondo 6 pattern: saturazione inferiore sinistra (A), cluster cellulare mal delimitato (B), fuso orizzontale (C), doppio cluster (D), fuso-cluster (E), cluster ben delimitato (F). Nei casi con pattern B e F si è avuta una maggior detection rate della popolazione fluorescente su AC ($p < 0.01$). L'MCV dei campioni senza EB è inferiore nei casi con SP A, C ed E ($p < 0,05$). L'incidenza di allarmi strumentali su CG è più alta nei casi con pattern A, C, D, E ($p < 0.05$).

Conclusioni. Il valore predittivo positivo del flag NRBC su CG è 16%. Fattori interferenti sono le piastrine giganti e gli aggregati piastrinici, che per dimensioni, conduttività e scatter sono vicini agli EB, e le emazie microcitiche che, per la maggior resistenza alla lisi, vengono posizionate nello SP con i pattern A, C ed E. La persistenza del tipo di allarme e pattern nello stesso paziente in tempi diversi potrebbe essere dovuto a proprietà peculiari delle emazie o ai fattori interferenti. La non corretta identificazione in citofluorimetria potrebbe essere dovuta al basso numero di EB, inferiore alla soglia di rilevazione dello strumento e/o al mascheramento da parte dei fattori interferenti, data la maggior detection rate su AC nei casi con pattern B e F. In presenza di un pattern B o F su CG, associato o meno ad allarme FP su AC appare quindi opportuno effettuare una verifica microscopica della presenza di EB.

Bibliografia

- D'Onofrio et al. *Lab Hem.* 1996;2:131-38.

073

THE LABORATORY OF HAEMATOLOGY IN THE AUTOIMMUNE DISEASEE. R. Testa¹, A. Dominijanni², R. Testa³, F. Iuliano⁴, P. Puzzonio², G. Parlato¹¹*Clinical Biochemistry, University Magna Græcia, Catanzaro*²*Immunohematology, Trasfusion Medicine, Hospital Pugliese Ciaccio, Catanzaro*³*Clinical Medicine, Hospital Vittorio Emanuele, Catania*⁴*Oncology, Hospital, Rossano, Italy*

Introduction. The therapy of the patients affected of autoimmune cytopenia (thrombocytopenia autoimmune haemolytic anaemia) is based mostly on the employment of steroids to the dose of 1 mg/kg/die. In the refractory patients the employment of the Rituximab (specific monoclonal antibody towards the antigen CD20) has increased the percentage of answers (partial and complete) demonstrating the activity in vivo. 12 Patients have been treated, from the service of haematology, in a temporal arc of approximately 1 year: 6 affecteds from refractory autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) and 6 affecteds from autoimmune piastrinopenia everyone of which it has received 4 cycles of Rituximab 375mg/m² for week. Everybody had received a previous corticosteroid treatment associated with an other immunosuppressive therapy, the medium age to the diagnosis was 57 years (age 38-79 years) without difference between two sex (m/f 1:1).

Materials and methods. In all piastrinopenic patients have been executed determination of platelet emivita with marker isotope nuclear, while in the patients with AIHA following immunohaematologic analyses have been executed: warm antibody search, cold agglutinins and coomb's test with following outcomes: 4 of the 6 patients AIHA (3 idiopathics, 1 affected of lymphoproliferative disorder) have developed warm antibodies; 1 patient, affected of haemolytic anaemia, secondary to a mieloproliferative disorder is negative to coomb's test.

Results. At six months from the term of the therapy with Rituximab 3 of the 6 patients are negative coombs (50%), complete remission (platelet >130x 10⁹/microl) has happened in 4 (65%) of the 6 patients with pa and in 1 (16%) of the 5 patients with AIHA (HCT>38%), the medium time of answer (TMR) in the patients is of 9 weeks (range 6-13) the complete answer is maintained more than 14 months of follow-up in the responders. A single patient is PA again 12 months later and he has obtained the RC with a second cycle standard doses of anti CD-20.

Conclusions. The our study demonstrates an important benefit of the treatment of the autoimmune refractory cytopenia with Rituximab, of particular relief is the negativation of the direct coombs test in 50% of the patients, not obtainable with steroid therapy.

074

SCREENING PER LA PREVENZIONE DELLA TALASSEMIA SUL TERRITORIOF. Bamonti¹, C. Novembrino², R. De Giuseppe¹, V. Uva¹, E. Cassinerio³, C. Refaldi³, M. D. Cappellini³¹*Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano*²*Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano*³*Dipartimento di Medicina Interna, Centro Anemie Congenite, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano*

Le sindromi talassemiche sono un gruppo di disordini ereditari a carattere recessivo a carico del globulo rosso. Lo specifico difetto genetico può dar luogo all'assenza o ad una ridotta sintesi delle catene globiniche costituenti la molecola di emoglobina; la classificazione della talassemia dipende dalle catene globiniche interessate.

La talassemia è presente in tutte le etnie, anche se con diversa prevalenza. Remote e recenti ondate migratorie, che hanno coinvolto gruppi etnici con un'alta prevalenza delle mutazioni legate alla talassemia, hanno modificato la situazione nelle aree non endemiche(1).

Allo scopo di valutare la prevalenza delle sindromi talassemiche in Lombardia, è in corso uno screening sul territorio utilizzando un'unità mobile dotata di laboratorio ed ambulatorio. Nel periodo fra marzo e aprile 2007, sono stati arruolati 90 soggetti (50% M, età 36.8±15.2 anni) i quali, dopo valutazione clinica, sono stati prelevati per effettuare l'analisi emocromocitometrica (analizzatore CD 1700, Abbott Diagnostics), la misurazione dei parametri dello stato marziale (analizzatore Modular, Roche) e la separazione delle frazioni emoglobiniche (sistema HPLC-723 G7, Tosoh). Ove necessaria è stata effettuata un'analisi genetica mediante gap-PCR e sequenziamento diretto.

Da questo studio preliminare è emerso che il 16% dei soggetti analizzati mostrava una microcitosi, la quale solo nel 22% dei casi era dovuta a sideropenia. Dall'analisi dei cromatogrammi relativi all'assetto emoglobinico, l'89% dei soggetti risultava nella norma; tuttavia, nel 18% di questi l'indagine genetica evidenziava alfa talassemia. Inoltre, il 9% dei cromatogrammi era indicativo di una beta talassemia e il 2% di delta talassemia.

Si può concludere che un'accurata analisi clinica e la valutazione di idonei parametri di laboratorio sono essenziali per il controllo e la riduzione dell'incidenza delle sindromi talassemiche. I dati preliminari raccolti in Lombardia dimostrano che la prevalenza dei portatori di talassemia è drammaticamente aumentata negli ultimi anni e che l'intervento con idonei programmi di prevenzione, volti ad individuare coppie "carriers", potrebbe ridurre la nascita di soggetti affetti.

Bibliografia

1. Modell B. et al, Scand J Clin Lab Invest 2007;67:39-69

075

7-COLOR MULTIDIMENSIONAL FLOW CYTOMETRY (MDF) TO IDENTIFY NORMAL AND ABNORMAL MYELOID AND MONOCYTOID POPULATIONS

F. Gervasi¹, V. Tortorici¹, C. Giambanco¹, G. Cardinale¹, S. Neri¹, G. Pagnucco¹

¹Laboratorio U.O. Ematologia, Dip. Oncologia, A.R.N.A.S Civico, P.O. M. Ascoli

Introduction. The aim of this study is to correlate the normal antigen expression during hematopoietic development as determined by MDF with the dysregulation of hematopoiesis observed in MDS, and MPDs.

Material and methods. Bone marrow aspirates and peripheral bloods from 10 patients without hematological disease, and from 35 patients with a diagnosis of de novo MPDSs, and MDSs were analyzed by flow cytometry. Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were collected along with 6-7-color antibodies combination to generate 8-9 parameters per cellular event. Flow cytometric immunophenotyping was performed on Cyan ADPTM (Dako, Ft Collins, CO, USA) by collecting from 50000 to 100000 viable ungated list mode events. The following panel of antibodies was used in all of the cases:

(CD66b-Fitc/CD235a-Pe/CD45-Pe-Texas Red/CD34-Pe-Cy5/CD11b-Cy7/CD71-APC)

(CD13-Fitc/CD15-Pe/CD45-Pe-Texas-Red/CD38-Pe-Cy5/CD33-Pe-Cy7/CD117-APC/CD16-APC-Cy7)

(TdT-Fitc/CD56-Pe/CD45-Pe-Texas Red/CD10-Pe-Cy7/Mpo-APC/CD34-Pe-Cy5).

The monoclonal antibodies (MoAbs) used were purchased from Becton Dickinson (BD, San Jose, CA, USA), Dako (Carpinteria, CA, USA), and Caltag Laboratories (San Francisco, CA, USA) available commercially in Italy through Valter Occhiena S.r.l. (Torino, Italy). Data analysis was performed using Summit TM software (Dakocytomation, Ft Collins, CO, USA).

Results. The combinations of anti-CD13, anti-CD33, anti-CD11b anti -CD66b are particularly useful for identifying maturational anomalies or asynchronous antigen expression, CD11b, CD13 and DR acquisition are useful to study normal neutrophil development from myeloid precursor to mature cells.

In conclusion. The patterns of expression of myeloid antigens that we observe in normal marrow are similar to the patterns described in literature with three or four color. 7-color flow cytometry is capable of distinguishing normal from abnormal myelopoiesis

In our experienced laboratory, 7-color flow cytometry has an important role in the diagnostic workup of MPDs and MDSs

References

Martin Benesch, H. Joachim Deeg, Denise Wells and Michael Loken. Hematology, June 2004 Vol.9(3), pp. 171-177. Flow Cytometry for Diagnosis and Assessment of Prognosis in Patients with Myelodysplastic Syndromes

076

DETECTION OF CIRCULANT MONOCLONAL PLASMA CELL IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED MULTIPLE MYELOMA AND MGUS

F. Gervasi¹, V. Tortorici¹, c. Giambanco¹, G. Cardinale¹, M. Pagliaro¹, F. Bondi¹, C. Tomaselli¹, G. Pagnucco¹

¹Laboratorio U.O. Ematologia con TMO Dip. Oncologia A.R.N.A.S Civico-Benfratelli, G. Di Cristina e M. Ascoli, Palermo

The aim of this study was to quantitate the number of circulating monoclonal plasmacells in the peripheral blood of patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM) and in the monitoring of these patients and in patients with monoclonal gammopathies of uncertain significance (MGUS). We think that circulating plasma cells (PCs) can be detected in the peripheral blood of a great proportion of patients with MM and with MGUS. The appearance of circulating PCs in the blood may be simply a reflection of a tumor mass, but it could also represent differences in the disease biology. Myeloma progression and resistance to therapy are mediated by cell-to-cell adhesion and cell-to-stroma adhesion. We, in agreement with other groups, believe that the appearance of circulating PCs in the blood identifies relative independence from adhesion to the microenvironment and, in other words, signifies more aggressive disease. To these purposes we analyzed by flow cytometry peripheral blood samples from 10 patients without hematological disease, and from 15 patients with a diagnosis of de novo MM and from 20 patients with MGUS diagnosed on standard criteria, which were referred to our Division from march 2004 to april 2007. Flow cytometry analysis was conducted with lyse no wash method. Cells were stained with fluorescence-labelled CD38 FITC, CD56 PE, CD19 PE-Cy5, CD138APC and CD45 PB antibodies (from Dako, Glostrup, Denmark). Circulating PCs were detected in all MM patients with the median PC count of 7 per 1.000.000 events. Circulating PCs were found in all patients; 5 MM patients had 1 to 10 circulating PCs. The remaining 10 patients had more than 10 circulating PCs. Circulating PCs were also detected in MGUS patients with the median PC count of 3 per 1.000.000 events. We didn't found any correlation between the degree of marrow involvement by PCs and the number of circulating PCs.

Our preliminary results show that PCs in peripheral blood represent differences in myeloma disease biology.

077

VALUTAZIONE DELLA PREDITTIVITA' DELLE PIASTRINE RETICOLATE IN UN CASO DI MORBO DI WERLHOFF. Gioia¹, P. Merlo¹, G. Martinelli², G. Crovetti², S. Cione¹, A. Giani¹¹Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, A.O. Ospedale di Circolo di Busto Arsizio, Varese²SIMT, A.O. Ospedale di Circolo di Busto Arsizio, Varese

Scopo. Le piastrine reticolate (RPs) rappresentano la quota di piastrine "giovani" che per prime vengono rilasciate in circolo e che si caratterizzano per elevato contenuto di acido nucleico, risultando quindi espressione del turn-over piastrinico. E' già noto che la loro valutazione rappresenta un indice utile nella diagnosi di Morbo di Werlhof. Si presenta il caso di una paziente con PTI all'esordio in cui l'andamento delle RPs è stato monitorato durante la terapia impostata.

Materiali e Metodi. Contaglobuli ADVIA 120 (Bayer); Citofluorimetro a flusso EPICS XL (Beckman Coulter); Reticount (thiazole orange) Becton Dickinson; un controllo negativo: campione con conta piastrinica nella norma. Preparazione controllo: 1 ml PBS + 10 μ l plasma ricco di piastrine (PRP); campione paziente: 1ml Reticount + 40 μ l PRP (Plt <5000/mm³). Incubazione a T. ambiente 90'. Il test è stato eseguito dal giorno 0 (plt: 4x10^{<3>}/ μ L fino al giorno 8 (plt >50 x10^{<3>}/ μ L

Dati del paziente. L.C., donna, 37 anni; TCI e TCD negativi; conta piastrinica all'esordio: 4000/mm³; presenza di anticorpi anti-piastrine a specificità anti-GPIIb/IIIa; megacariociti midollare aumentati; assenza di diatesi emorragica.

Risultati. Diagnosi Morbo di Werlhof.

Monitoraggio RPs. Sono stati complessivamente valutati 8 campioni prelevati in giorni consecutivi. tabella 1

Andamento clinico. Alla diagnosi è stata iniziata terapia corticosteroidica; la paziente è rimasta asintomatica fino alla ripresa della conta periferica piastrinica. Non è stato effettuato alcun supporto trasfusionale.

Conclusione. Il monitoraggio delle RPs in PTI all'esordio ha consentito di valutare sia la risposta alla terapia farmacologica impostata, che i tempi di tale risposta proponendosi come possibile parametro di valutazione di predittività; il valore elevato di RPs ha infatti anticipato l'incremento della conta piastrinica periferica, testimoniando il ripristino del corretto turn over piastrinico.

Bibliografia. "Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusion after intensive chemotherapy" Chaoui D. et al. Transfusion 2005;45:766-772

Giorno	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Plt x10 ^{<3>} / μ L	4	4	4	4	7	10	24	37	63
RPs %	10.56	39	31.7	30.4	32.8	24.8	17.9	12.5	11.5

078

VALORI DI RIFERIMENTO DELLE VARIABILI EMATOLOGICHE IN UNA POPOLAZIONE ADULTA E SENILEBiella¹, A. Cappellani¹, E. La Valle¹, G. Limonta¹, P. Tramacere¹, P. Brambilla¹, P. Mocarelli¹¹Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio Ospedale di Desio, Desio, Milano

Introduzione. La definizione dei valori di riferimento delle variabili emocromocitometriche riveste notevole importanza nella diagnostica ematologica. Per stabilire i valori di riferimento nelle varie fasce di età e nei due sessi sono stati analizzati i dati dell'archivio informatico del nostro laboratorio relativi agli esami eseguiti tra il 1990 e il 2007.

Materiali e metodi. Le misurazioni degli analiti sono state eseguite con i contaglobuli automatici ADVIA 120-Bayer (1990-2006) e XE 2100-Dasit (2006-2007). Sono stati selezionati consecutivamente i soggetti afferenti al laboratorio che avevano eseguito l'esame emocromocitometrico una sola volta all'anno ed esclusi i soggetti con alterazione degli indici infiammatori, del profilo marziale, del metabolismo di acido folico e vitamina B12, della funzionalità renale, della glicemia e le donne in gravidanza.

Risultati. La popolazione in studio, costituita da 187.967 soggetti (77078 maschi e 110.889 femmine) è stata suddivisa in classi di età di 5 anni ciascuna a partire dai 15 anni.

Le variabili RBC, HB e HT presentano, in entrambi i sessi, un significativo trend in decremento dopo i 70 anni di età (i valori medi di HB nei maschi diminuiscono a partire dai 70 anni da 15.0 \pm 1.2ds a 13.4 \pm 1.6 oltre gli 85 anni; nelle donne da 13.3 \pm 1.0 a 12.7 \pm 1.4). L'MCV mostra un trend in aumento in entrambi i sessi: fino ai 45 anni il valore medio è di 86 \pm 5.0ds aumentando progressivamente in modo significativo con l'età fino a raggiungere il valore di 90.8 \pm 4.9 oltre gli 85 anni. In età senile si rivela inoltre una riduzione della percentuale dei linfociti: fino a 60 anni di età il valore medio è di 37.0 \pm 9.0ds diminuendo progressivamente in modo significativo con l'età raggiungendo un valore di 30.0 \pm 9.4 oltre gli 85 anni.

Conclusioni. I valori di riferimento e le variazioni con l'età riscontrati nello studio sono concordi con la letteratura, sebbene i riferimenti disponibili al riguardo siano ad oggi scarsi.

Bibliografia

Determination by flow cytometry of reference values of erythrocyte parameters in aged subjects. Presse Med. 2001;30:779-84. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? Blood. 2006;107:1747-50.

079

RISCONTRO DI EMOGLOBINA FETALE IN ETA' ADULTA: PREVENZIONE DELLE EMOGLOBINOPATIE E VALORI DI RIFERIMENTOG. Ivaldi¹, D. Leone¹, C. Viaggi¹, D. Pascotto¹, F. Moruzzi¹¹Lab. di Genetica Umana-Microcitemia, Osp. Galliera, Genova

Una emoglobina fetale (Hb F) superiore all'1% in un individuo adulto può essere il risultato di uno o più difetti genetici oppure il prodotto di anomalie ematologiche acquisite. Ciò che definiamo persistenza ereditaria di emoglobina fetale (HPFH) è quindi solo una, e certamente meno rilevante dal punto di vista clinico, delle possibili cause di aumento di Hb F. Alla luce di tali considerazioni abbiamo ritenuto utile:

- comprendere quale ruolo può avere il laboratorio nella eventuale diagnostica differenziale in presenza di Hb F aumentata;
- valutare mediante analisi del DNA l'eventuale significato molecolare della presenza dell' Hb F;
- decidere quali valori di riferimento può essere più opportuno indicare nella comunicazione del risultato nei diversi casi in cui aumenta l'Hb F.

Seguendo le linee-guida specifiche per le emoglobinopatie abbiamo potuto distinguere e valutare numerosi soggetti adulti che presentavano aumenti ereditari o derivati dell'Hb F.

Abbiamo in molti casi deciso, in accordo con i clinici, di approfondire, mediante un approccio molecolare sostanzialmente basato sul sequenziamento nucleotidico diretto dei geni globinici, l'eventuale causa genetica della presenza dell'Hb F soprattutto quando non era evidente una causa acquisita.

Tale nostro studio si è basato sulla osservazione di 950 soggetti portatori di HPFH, talassodrepanocitosi, beta talassemia eterozigote, delta-beta talassemia, Hb Lepore, Hb instabili; oltre a donne in gravidanza, soggetti affetti da leucemie o anemia aplastica. Abbiamo potuto ricostruire un quadro molto eterogeneo della presenza dell'Hb F nell'adulto e soprattutto modificare i valori di riferimento dell'Hb fetale soprattutto in gravidanza e in presenza di particolari trait beta talassemici: raddoppiando o triplicando il valore limite di riferimento normale. E' stato infine possibile definire degli intervalli di riferimento dell'Hb F in presenza delle più comuni forme di HPFH.

L'aspetto più interessante di tale lavoro è stato proprio il tentativo di "personalizzare" i valori di riferimento nelle diverse condizioni patologiche.

Bibliografia

Préhu C. et Al. Determination of Hb F levels: the routine methods. Hemoglobin 22:5-6,459-467,1998.

080

USEFULNESS OF URINE IMMUNOFIXATION ELECTROPHORESIS IN THE DIAGNOSIS OF AL AMYLOIDOSISG. Merlini¹, G. Palladini¹, P. Russo¹, F. Lavatelli¹, M. Nuvolone¹, G. Sarais¹, S. Casarini¹, T. Bosoni², G. V. Melzi D'Eri³, R. Moratti²¹Centro Amiloidosi, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università, Pavia²Lab. Biochimica Clinica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università, Pavia³Dip.di Medicina e Chirurgia, Università, Milano

The characterization of biopsy-proven systemic amyloidosis as AL type, demands the detection of a monoclonal light chain in serum and/or urine. It has been proposed that the combination of serum immunofixation electrophoresis (SIFE) and of the measurement of circulating free light chains (FLC) might identify a monoclonal component in almost all the patients, thus rendering urine immunofixation electrophoresis (UIFE) unnecessary (1). Here we evaluate the diagnostic sensitivity of SIFE, the quantitative FLC assay and their combination in 100 consecutive patients with biopsy-proven AL amyloidosis, in whom a monoclonal FLC was detected by UIFE.

UIFE was performed with anti kappa and lambda antibodies (Dako, Glostrup, Denmark), on agarose gels prepared at our laboratory. SIFE was performed with a Hydrigel 2IF/BJ(HR) kit on a Hydrasys apparatus (Sebia, Evry, France). Serum FLC concentration was measured by a latex enhanced immunoassay (The Binding Site, Birmingham, UK) on a Behring BN II (Dade Behring, Deerfield, IL, USA) nephelometer. The light chain type constituting the amyloid deposits was unequivocally identified by immunoelectron microscopy and corresponded to that detected by SIFE and UIFE in all cases.

The diagnostic sensitivity of the tests are reported in the Table. In the overall population SIFE and FLC measurement had the same sensitivity (78%), but the FLC test performed better with kappa clones, correctly identifying all patients. SIFE and FLC measurement combined missed 6% of patients in whom a monoclonal light chain was detected by UIFE. In patients with AL amyloidosis urine immunofixation should be performed to ensure best sensitivity.

1. Clin Chem 2005;51:805-7.

Table. Diagnostic sensitivity, % (95% CI)

	Overall (N=100)	κ clones (N=27)	λ clones (N=63)
SIFE	78 (70-86)	56 (39-74)	86 (78-93)
FLC κ/λ ratio	78 (70-86)	100 (87-100)	70 (60-80)
SIFE +	94 (89-98)	100 (87-100)	92 (85-97)
FLC κ/λ ratio			

081

AVVICENDAMENTO DI SISTEMI PER L'ESAME EMOCROMOCITOMETRICO: VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA DEI RISULTATI FORNITI DA DUE CONTAGLOBULI AUTOMATICIL. Bressan¹, A. Landino¹, F. Ossola¹¹A.O. Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

L'esame emocromocitometrico fornisce indicazioni per evidenziare alterazioni degli elementi corpuscolari del sangue e della concentrazione dell'emoglobina (Hb). In ambito trasfusionale è eseguito per valutare l'idoneità alla donazione. Quando viene introdotto un nuovo sistema per analisi bisogna valutare la confrontabilità tra i valori forniti dal sistema utilizzato precedentemente e quelli ottenibili con il nuovo. Scopo dello studio è valutare se l'avvicendamento tra due contaglobuli automatici basati su diverse tecnologie analitiche richiede l'adozione di differenti criteri di interpretazione dei dati dell'esame emocromocitometrico.

Abbiamo confrontato i risultati degli esami emocromocitometrici eseguiti in occasione di 1179 donazioni del 2001 (gruppo 01) e 1350 del 2003 (gruppo 03), utilizzando i contaglobuli Advia 120 (Bayer), per l'analisi dei campioni del gruppo 01, e SE-9500RET (Sysmex) per quelli del gruppo 03. I valori ottenuti sono stati stratificati per sesso e fascia d'età: 18-35, 36-55 e 56-65 anni. La significatività delle differenze è stata valutata con il test di Student (livello di significatività: 0,05).

I dati forniti dagli strumenti presentano differenze significative per i parametri che, nei due contaglobuli, sono misurati con diversi metodi analitici (Plt e MCV) o che da questi vengono derivati. Per Plt le differenze interessano tutte le fasce di età di entrambi i sessi; per ematocrito (Hct), volume corpuscolare medio (MCV), contenuto corpuscolare medio di Hb (MCH) e concentrazione corpuscolare media di Hb (MCHC), le differenze sono più evidenti tra i 18-35 anni e i 36-55 anni sia per i maschi che per le femmine. Nella fascia di età 56-65 anni si osservano differenze significative per MCHC in entrambi i sessi; Hct e MCV mostrano differenze significative solo per i maschi e per MCH solo per le femmine. WBC e RBC (conta degli eritrociti) presentano differenze significative limitate ai donatori maschi di età tra 18-35 anni; per Hb le differenze significative riguardano i donatori di entrambi i sessi tra 18 e 35 anni e solo i maschi tra 36 e 55 anni. Le differenze, sebbene statisticamente significative, non appaiono rilevanti dal punto di vista clinico e non richiedono l'adozione di differenti criteri di interpretazione.

082

INCREMENTO DELLE EMOGLOBINE PATOLOGICHE RILEVATO NELLA ZONA DI PIACENZA NEGLI ULTIMI DUE ANNIL. Santori¹, M. Rastelli¹, S. Vercesi¹¹Laboratorio Analisi Cliniche, Ospedale "G.da Saliceto", Piacenza

Nella nostra provincia, nella popolazione esaminata sino al 1993 le emoglobinopatie non erano particolarmente rilevanti e la tipologia delle varianti emoglobiniche trovate era molto limitata: oltre alla beta talassemia erano state documentate soltanto le emoglobine S, C, Hasharon, Lepore e Camperdown.

Negli ultimi due anni abbiamo invece riscontrato un considerevole incremento sia delle emoglobinopatie che delle varianti emoglobiniche.

Materiali e metodi. I campioni di sangue sono raccolti in EDTA tripotassico e analizzati direttamente con riconoscimento del codice a barre. Per lo screening delle emoglobine usiamo il cromatografo HLC-723 G7 della Tosoh, completamente automatico. Esso utilizza una colonnina di resina a scambio cationico e tre eluenti di forza ionica crescente, secondo un programma in 5 step, predisposto per rilevare la presenza delle emoglobine F, A0, A2, D, S e C.

La calibrazione avviene per identificazione quantitativa delle emoglobine F e A2.

La conferma di tutte le altre frazioni identificate presuntivamente viene eseguita in Laboratorio di 2° livello che analizzano le catene globiniche in HPLC su fase inversa.

Risultati. Su 2120 campioni esaminati abbiamo documentato 42 casi di Hb A2 superiore a 3,8% (di cui 15 casi superiori a 6%). Tra le emoglobinosi abbiamo trovato:

Casi|Variante emoglobinica
 23 eterozigosi S
 11 eterozigosi C
 06 eterozigosi D
 01 eterozigosi O-Arab
 02 eterozigosi O-Padova
 02 eterozigosi G-Phil
 02 eterozigosi G-Copenaghen
 02 eterozigosi E
 08 Omozigosi S
 02 Omozigosi C
 02 eterozigosi S\C
 01 eterozigosi S\C Phil Ibrida

Considerazioni conclusive. E' evidente l'effetto che le migrazioni interne ed esterne degli ultimi decenni hanno causato sulla distribuzione delle emoglobine patologiche.

Bibliografia

Cao A: Carrier screening and genetic counselling in beta-Thalassemia. *Int J Hematol.* 2002; 76 (suppl II): 105-113. Siamo molto grati al professor Leone e alla dottoressa Mangione del Dipartimento di Patologia Clinica dell'Ospedale S. Anna di Torino, al professor Guidi della Facoltà di Medicina dell'Università di Verona e al professor Mosca del L.I.T.A. dell'Università di Milano per la loro preziosa collaborazione.

083

IRON DEFICIT IN HEALTHY ITALIAN WOMEN ACCORDING TO ORAL CONTRACEPTIVE USEM. Di Santolo¹, G. Casabellata¹, G. Banfi², G. Stel³, F. Gonano³, S. Cauci¹¹Department of Biomedical Sciences and Technologies, School of Medicine, University of Udine, Udine²Sanitar Direction, Orthopedic Galeazzi Institute, School of Medicine, University of Milano, Milano³Department of Experimental and Clinical Pathology and Medicine, School of Medicine, University of Udine, Udine

Background. Iron-deficient fertile women risk underdiagnosis. Our aims were to evaluate the impact of third generation oral contraceptives (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 Italian women (aged 24 years) were recruited. ID was defined by serum ferritin ≤ 20 microg/L combined with sTfR ≥ 1.45 mg/L (50th percentile in 203 healthy women). Anemia was defined by Hb < 12 g/dL.

Results. ID was detected in 35.5% (72/203) of study women, and in 31.0% (53/171) of non-anemic women. 59 women were OC users (59/203, 29%). 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 > 1.76 mg/L had sensitivity marginally better than ferritin < 10 microg/L (43.4% vs. 37.7%). Additionally, sTfR showed 92.4% specificity, 77.2% efficiency, 71.9% positive predictive value, and 78.4% negative predictive value among non-anemic women.

Conclusions. We first highlighted that sTfR is not affected by OC use. STfR is useful in the diagnosis of ID, especially in women using OC, where transferrin and transferrin saturation tests may be misleading. We found a high prevalence of ID in fertile Italian women. New generations of OC pills do not affect ID prevalence.

084

RETICOLOCITI ADVIA 120, SYSMEX XE 2100, PENTRA DX 120: CORRELAZIONE DI CONTEGGI E PARAMETRI QUALITATIVIP. Danise¹, A. Rovetti¹, D. Avino¹, G. Rescigno¹, A. Di Palma¹, G. Morelli¹, C. Esposito¹, E. Grimaldi²¹U.O.C. di Patologia Clinica, P.O. Umberto I, ASL SA1, Nocera Inferiore (SA)²Dip. Assistenziale di Medicina di Laboratorio, A.U.O. Federico II, Napoli

Introduzione. La conta reticolocitaria in automazione ha grande importanza nella diagnostica delle anemie. Lo studio dei reticolociti si articola in: conteggi in valori assoluti e percentuali; indici di maturazione I.M.: reticolociti a bassa, media e alta fluorescenza; parametri qualitativi: MCV e Contenuto in emoglobina reticolocitario (CH)

Scopo del lavoro è valutare il grado di oggettività raggiunto da questi parametri e la loro reale potenzialità nella clinica.

Materiali e metodi. Popolazione: 737 pz.(età 2 gg.-87 anni).

Analizzatori. PENTRA DX 120, ADVIA 120, SYSMEX XE 2100

Analisi statistica. Test di Spearman per la determinazione dei Coefficienti di Correlazione tra valori assoluti, indici di maturazione e parametri qualitativi dei tre analizzatori nella popolazione generale e nei 3 gruppi esaminati (reticolociti < 30.000 /mmc, fra 30.000 e 100.000, > 100.000 /mmc)

Risultati. In tab.

Discussione. Il conteggio dei reticolociti ha mostrato buona correlazione fra gli analizzatori.

La correlazione fra indici di maturazione è minore a causa del continuum di decremento del contenuto di RNA reticolocitario e del posizionamento non standardizzabile delle soglie.

I parametri qualitativi reticolocitari non sono forniti omogeneamente dagli analizzatori: MCV e CH reticolocitario, concettualmente diversi, hanno comportamenti sovrapponibili in molte situazioni cliniche per cui potrebbero essere usati indifferentemente. La qualità dei reticolociti valutata come volume o come contenuto di emoglobina è sufficiente a dare indicazioni diagnostiche o terapeutiche (adeguata o inadeguata qualità della eritropoiesi basale o in risposta alla terapia).
Bibliografia.

Brugnara C. Int J Clin Lab Res 1998;28(1):1-11

	Ret valori assoluti				IM Popolazione		
	TUTTI	<30000	30000-100000	>100000	LFR %	MFR %	HFR %
ADVIA/PENTRA	0.84	0.64	0.57	0.72	0.65	0.63	0.58
PENTRA/SYSMEX	0.92	0.82	0.76	0.88	0.76	0.74	0.67
SYSMEX/ADVIA	0.91	0.78	0.64	0.73	0.79	0.77	0.61
MCVr/MRV	0.82	0.73	0.85	0.85	=> Parametri qualitativi		
RetHe/CHR	0.87	0.72	0.91	0.94			
MCVr/CHR	0.78	0.75	0.78	0.76			
MRV/CHR	0.64	0.53	0.73	0.80			
MRV/RetHe	0.65	0.54	0.65	0.73			
MCVr/RetHe	0.68	0.56	0.72	0.65			

085

Hb TARRANT (ALFA 126 ASP>ASN): UNA RARA VARIANTE DELL'EMOGLOBINA CON AUMENTATA AFFINITA' PER L'OSSIGENO IN UNA FAMIGLIA ITALIANAP. Sala¹, A. Colatutto¹, G. Barillari², D. Leone³, C. Viaggi³, G. Ivaldi³¹SOC Analisi Clin. di Elezione, A.O.Univ. S. Maria della Misericordia, Udine²DPT di Area Vasta Immuno-Trasfusionale, A.O.Univ. S. Maria della Misericordia, Udine³Lab. Genetica Umana - Microcitemia, Osp. Galliera, Genova

Oltre 160 diverse mutazioni del gene alfa globinico sono associate alla produzione di emoglobine (Hb) con aumentata affinità per l'ossigeno (O₂) mentre meno della metà sono quelle che interessano i geni alfa globinici; queste sono nella maggior parte dei casi asintomatiche. L'espressione fenotipica caratteristica è l'eritrocitosi, che può variare in rapporto al difetto molecolare di base, a fenomeni allosterici associati, al pH, a fattori ambientali e costituzionali. Sono noti fenotipi diversi che oltre all'aumento dell'ematocrito e della quantità di Hb mostrano eritrocitosi; circa la metà di tutte queste varianti dell'Hb è silente alla separazione elettroforetica o in HPLC e non presenta sintomatologia clinica.

Un uomo di 46 anni, donatore di sangue per venti anni e successivamente sottoposto a salassi terapeutici periodici per la presenza di valori elevati dell'ematocrito, è stato da noi recentemente esaminato per la ricerca di eventuali difetti genetici all'origine della poliglobulia presente e a spiegazione del suo stato marziale. Gli esami di 1° livello specifici per le emoglobinopatie hanno subito indicato la presenza di una variante Hb del 24% e un valore della p50 significativamente inferiore alla norma.

L'analisi molecolare dei geni globinici ha mostrato:

a) una mutazione G>A al nucleotide 681 del gene alfa2 corrispondente ad una rara variante nota come Hb Tarrant (alfa 126 Asp>Asn), mai osservata nella nostra popolazione e caratterizzata da una aumentata affinità per l'ossigeno;

b) una doppia eterozigosi per le mutazioni C282Y e H63D del gene HFE;

c) negatività per la mutazione V617F del gene Jak-2.

Il risultato degli esami eseguiti ha permesso pertanto di escludere la presenza di una sindrome mieloproliferativa cronica, tipo Policitemia Vera indicando nel difetto genetico la prima causa della sintomatologia accusata dal propositus.

Lo studio della famiglia ha consentito di risalire alla presenza dell'Hb Tarrant nel padre del propositus che mostrava ematocrito elevato e necessità di salassi terapeutici negli ultimi anni di vita e nelle due figlie che sono del tutto asintomatiche. L'HPLC, la p50 e l'indagine molecolare si sono quindi rivelati i passaggi fondamentali per la diagnosi conclusiva.

086

MEASUREMENT OF RETICULATED PLATELETS BY USING AN AUTOMATED METHOD IN NORMAL SUBJECTSR. Caporale¹, A. Fanelli¹, F. Cesari², S. Mercurio¹, M. Rossetti¹, R. Abbate², G. Messeri¹¹Central Laboratory, Azienda Ospedaliero- Universitaria Careggi, Florence²Department of Medical and Surgical Critical Care, Thrombosis Centre, University of Florence; Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence

Introduction. The number of reticulated platelets reflects the rate of thrombopoiesis, so increasing when platelet production rises and decreasing when this production falls. Up to now RP have been measured through flow cytometry by using any fluorescent dye that binds RNA but this method is time-consuming, expensive and imprecise.

Recently, a fully automated method that uses blood cell counter for the quantification of reticulated platelets has been developed.

Aim. To determine the normal range of RP values and to assess the reproducibility and the stability after 24 hours of this method.

Methods. RP were measured in a sample of 60 healthy subjects, by using the Sysmex XE-2100 haematology analyser (Sysmex, Kobe, Japan). The flow cytometric determination of RP uses a proprietary fluorescent dye containing polymethine and oxazine. These two dyes penetrate the cell membrane staining the RNA in RP. The stained cells are passed through a semiconductor diode laser and the resulting forward scatter light and fluorescent intensity were measured. A computer algorithm (Sysmex IPF Master) discriminates between mature platelets and RP. RP were expressed as a percentage of RP of the total optical platelet count (immature platelet fraction; IPF) as an absolute number of RP/ l (IPF#) and as the percentage of RP highly fluorescent (H-IPF).

Results. The median IPF count was 2.8% (0.9-5.6), the median IPF# was 6,250 (2,400-12,800) platelets/L and the median H-IPF was 0.9% (0.2-2.0).

The reproducibility of the method within the four repeat analyses on 15 different samples was good. The average coefficient of variation (CV) for IPF was 10.6%, for IPF# was 10.9% and for H-IPF was 18.8%.

In 20 samples kept for 24 hours at room temperature we performed a second measure. A significant increase in the median values of IPF, H-IPF and IPF# was observed [IPF:3.1 (1-5.6) vs 4.0(1.30-8.60) p<0.001; H-IPF 0.9(0.30-2.0) vs 1.1 (0.2-4.20) p<0.01; IPF# 6600 (3000-12500) vs 8900 (2900-17400) p<0.001].

Conclusions. This study demonstrates that the measure of RP by using a fully automated and rapid method is reproducible. However the analysis should be executed within the 24 hours after blood collection.

087

LENGTH OF SEDIMENTATION REACTION IN BLOOD: A COMPARISON BETWEEN PLASMA-CITRATE AND K2-EDTA BLOOD SAMPLES

R. Zenobi¹, F. G. Viola¹, S. Ballerini¹, L. Bellincampi¹, G. Federici¹

¹Department of Laboratory Medicine, University-Hospital of "Tor Vergata" Rome, Italy

The erythrocyte sedimentation rate (ESR), now more appropriately referred to as "length of sedimentation reaction in blood (LSRB)", remains the most widely used laboratory test for monitoring the course of infections, inflammatory diseases and some types of cancer. In addition, it is simple and low-cost. The most commonly used procedures for LSRB determination requires plasma-citrate blood samples, following ICSH (International Committee for Standardization in Haematology) recommendations. It is no unlikely that LSRB blood samples are insufficient, especially in children and in haemathological patients. In order to resolve this inconvenient, we compared LSRB measurement in plasma citrate and in K2-EDTA blood samples.

We performed our study on 300 whole blood samples from patients of Medicine Laboratory of University Hospital "Tor Vergata" Rome, using an automated procedure (VES-MATIC 60 DIESSE s.p.a., Grosseto, Italy)

Plasma citrate blood samples were analyzed and used as control, whereas K2-EDTA blood samples were transferred in tubes containing sodium-citrate and then analyzed.

Our data showed that LRSB values obtained by the two different anticoagulants were the same with a statistically significant correlation ($r=0.99$).

In conclusion, LSRB can be eventually measured from the tube collected for hemochrome analysis and so resolve the inconvenient of insufficient samples.

References

Ozdem S, Akbas HS, Donmez L, Gultekin M.

Comparison of TEST 1 with SRS 100 and ICSH reference method for the measurement of the length of sedimentation reaction in blood.

Clin Chem Lab Med. 2006;44(4):407-12

088

AUMENTATA ESPRESSIONE DEL CD64 DEI NEUTROFILI NELLA SIRS CON E SENZA SEPSI

V. Rocco¹, G. Gaudenzi¹, N. Sarracco¹, M. C. Simeone¹, T. Catalano²

¹Lab. Patologia Clinica A.O. "Rummo", Benevento

²Sezione AIL "Stefania Mottola", Benevento

Obiettivi. Valutare l'espressione del CD64-PMN nella diagnosi precoce delle SIRS+Sepsi e SIRS. Poiché lo aumento dell'espressione del CD64 è molto rapida e la normale emivita dei PMN nel sangue periferico è di circa 6 ore, valutare se l'espressione del CD64-PMN possa fornire una indicazione dello stato corrente di una risposta infiammatoria acuta sistemica ad una infezione nel follow-up dei pazienti con SIRS e/o Sepsis.

Materiali e Metodi. L'emocromo è stato eseguito con ADVIA120(Siemens). L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita con XL-MCLCoulter). Il CD64 è stato valutato mediante marcatura con anti-CD64-FITC(MSIgG1). La espressione del CD64, espresso in maniera irrilevante dai neutrofili, è stata data come MFI ed anche come % delle cellule positive. Per tutti i pazienti valutati sono stati eseguiti anche i test per la CRP (CRP-HS, Siemens) e per la PCT (BRAHAMS) e i risultati comparati con l'espressione del CD64PMN. Sono stati valutati: 20 donatori sani utilizzati come controllo negativo (PCT negativi e CRP negativi): PMN CD64 MFI 4.86; media PMN CD64+ 2.6% (1,5-3.0); 20 pazienti ricoverati in ICU costantemente negativi alle culture (PCT negativi e CRP positivi): PMN CD64 MFI 12.8; media PMN CD64+ 47,7% (43-72); 12 pazienti ricoverati in ICU con culture positive (PCT positivi e CRP positivi): PMN CD64 MFI 55.3; media PMN CD64+ 97.7% (99-100); 8 pazienti con infezione da EBV (PCT negativi e CRP positivi): PMN CD64 MFI 20,7; media PMN CD64+ 87% (80-83); 5 pazienti di Pronto Soccorso con neutropenia, flag per presenza di IG e quadro citografico suggestivo per presenza di Band. Questi ultimi 5 pazienti sono stati anche valutati mediante campioni seriali prelevati a distanza di 24 ore e dopo istituzione di terapia antibiotica subito dopo il ricovero.

Conclusioni. Elevata significatività del MFI del CD64 PMN e della % delle cellule positive sia per i pazienti ICU, negativi per culture che per PCT; elevata significatività fra pazienti con PCT e culture positive. Non significativo il MFI del CD64PMN nei pazienti con virosi rispetto ai pazienti con SIRS, mentre significatività c'è fra pazienti con virosi e pazienti con Sepsis. La valutazione seriale del CD64+ consente un migliore follow-up del paziente in terapia antibiotica rispetto alla valutazione seriale mediante PCT.

089

MACROPROLATTINA - UN CRITERIO DI RILEVAZIONE: PRECIPITAZIONE CON PEG 8000 E DOSAGGIO IgG SUL SOVRANATANTEA. Giani¹, V. Mainini¹, F. Gioia¹, M. Castiglioni¹, D. De Francesco¹¹Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Ospedale di "Circolo" di Busto Arsizio, presidio di Busto Arsizio, Varese

Scopo. Delle tre forme principali di prolattina presenti nel siero, la molecola di BigBigPRL (o macroprolattina) è costituita da un complesso di IgG e PRL (150-170 kDa) ed ha una scarsa attività biologica in vivo. Dosata più o meno intensamente dai metodi commerciali oggi disponibili, causa una sovrastima del valore di prolattina circolante.

Materiali e metodi. Dosaggio immunometrico in chemiluminescenza in fase solida a doppio sito (Immulite 2000 Medical Systems-Genova): valori normali 1.9-25 ng/ml.

Analisi di 50 sieri così suddivisi: 25 sieri con valore normale di prolattina e 25 sieri con valore di prolattina tra 25 - 105 ng/ml. Trattamento dei sieri con PEG 8000 (300 microL di siero+300 microL di PEG 8000 25% in PBS 7.4). Incubazione 10' a T° ambiente; centrifugazione per 5' a 11000g. Successivo dosaggio sul sovrinatante della prolattina residua. Sono positivi per macroprolattina, i sieri con recupero inferiore al 40% del valore di prolattina iniziale. Dosaggio sia sul sovrinatante che sul precipitato (risospo con 300 microL di PBS 7.4) di IgG totali (dosaggio immunoturbidimetrico per analizzatori Olympus -Segrate, Milano).

Risultati. I sieri analizzati presentano una incidenza del 10% di macroprolattinemia. I dosaggi delle IgG su sovrinatante sono negativi e su precipitato sono compatibili con i valori di IgG sieriche dei pazienti, a conferma dell'avvenuta precipitazione della macroprolattina.

Conclusioni. Se la presenza di macroprolattina genera nei pazienti indagini diagnostiche e trattamenti terapeutici non necessari anche una diagnosi mancata di iperprolattinemia vera può avere conseguenze dannose. Il dosaggio delle IgG sul sovrinatante nei casi dubbi o di recupero borderline (tra 40 e 60%) può essere importante dal punto di vista laboratoristico per selezionare quei campioni da analizzare ulteriormente con metodica cromatografica.

Bibliografia

F.Casanueva et al: Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas—Clinical Endocrinology (2006) 65,000-000

090

EVALUATION OF ANALYTICAL SENSITIVITY FOR TWO ECLIA METHODS FOR THYROGLOBULINC. Carrozza¹, S. Baroni¹, E. Di Stasio¹, C. Morlacchi¹, S. Palumbo¹, C. Zuppi¹¹Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University, Rome

Introduction. Thyroid gland is the unic source of Thyroglobulin (TG) production. An increasing of TG level in serum of patients treated with total thyroidectomy and consequent tissue remnant 131I ablation points out a disease recurrence in follow up of differentiated thyroid cancer (DTC). Thus, the assay limit of sensitivity is important to detect TG low serum concentrations and to observe its little variations.

The aim of our study was to evaluate the analytical sensitivity of two TG commercial automated immunoassays.

Materials and methods. We selected 50 patients treated with total thyroidectomy and consequent tissue remnant 131I ablation with negative values for antibodies anti-Thyroglobulin. The TG determinations were measured on Modular E170 (Roche Diagnostics), and on Access UniCel Dxl800 (Beckman Coulter). For both assays the claimed analytical sensitivity is 0.1 ng/mL.

Results. All studied patients gave on Modular E170 a TG value <0.1 ng/ml. In the graph below frequencies' distribution of TG values obtained with Access UniCel Dxl800 are reported (range 0.01-0.4 ng/ml). The analytical sensitivity verified for the Beckman assay was 0.01 ng/mL, therefore this assay is ten time more sensitive than the Roche one. At 0.05 ng/mL the imprecision (CV%) was 25%.

Conclusions. The Beckman TG assay can be considered a high sensitivity method, then clinically useful specially in follow up of DTC patients, when little TG variations in serum should point out a recurrency of malignancy.

091

VALUTAZIONE DEI MARCATORI BIOCHIMICI DI FORMAZIONE E RIASSORBIMENTO OSSEO IN PAZIENTI CON ACROMEGALIAF. Pagani¹, G. Bonetti¹, G. Mazziotti², A. Giustina²¹*U.O. Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, A.O. Spedali Civili, Brescia*²*U.D. Endocrinologia, A.O. Spedali Civili, Brescia*

L'acromegalia è una rara patologia causata da un'ipersecrezione dell'ormone della crescita (GH). L'eccesso di GH esercita un'attività anabolica sul tessuto osseo, tuttavia non è infrequente il riscontro di un'alterazione del rimodellamento. In questo studio abbiamo valutato in un gruppo di tali pazienti i marcatori biochimici di formazione (fosfatasi alcalina ossea, BALP; osteocalcina, OC) e di riassorbimento osseo (desossipiridinolina urinaria libera, U-DPD; telopeptide N-terminale del collagene I urinario, U-NTX-I). Il gruppo era composto da 48 pazienti acromegalici, 21 maschi (età 18-78 anni) e 27 femmine (età 19-78 anni). I valori medi (intervallo) erano i seguenti: BALP(n=38) 48 U/L (17-94); OC(n=22) 35 µg/L (10-88); U-DPD(n=48) 8.4 µM/Mcrea (2.1-26.5); U-NTX-I(n=31) 75 µM BCE/Mcrea(11-275). Valori elevati di BALP (>50 U/L) si evidenziavano nel 32% dei pazienti, di OC (>32 µg/L) nel 45%, di U-DPD (maschi>5.3, femmine>7.0 µM/Mcrea) nel 63%, di U-NTX-I (>70 µM BCE/Mcrea) nel 29%. In 12 pazienti con sospetta osteoporosi veniva calcolato, dal rapporto tra i valori di OC e di U-DPD relativizzati al limite superiore di riferimento, un "Indice di Rimodellamento Osseo" (IRO) (<0.9 aumentato riassorbimento, >1.1 aumentata formazione); 7 (58%) pazienti evidenziavano un IRO <0.9. La correlazione tra i due marcatori di formazione ossea portava al seguente risultato: OC vs BALP (n=22) r=0.449. La correlazione tra i due marcatori di riassorbimento osseo U-NTX-I e U-DPD (n=31) portava ad un coefficiente r=0.494. Correlando un marcatore di osteoformazione con un marcatore di riassorbimento si ottenevano i seguenti coefficienti di correlazione: BALP vs U-DPD(n=38) e vs U-NTX-I(n=22), r=0.227(NS) e r=0.558; OC vs U-DPD(n=22) e vs U-NTX-I(n=19), r=0.203 (NS) e r=0.498,rispettivamente. In questo gruppo di pazienti i risultati dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo evidenziano un prevalere del riassorbimento, dato che contrasta con la fisiopatologia tipicamente anabolica dell'acromegalia. Ulteriori studi sono necessari per approfondire i risultati delle correlazioni tra marcatori di formazione e marcatori di riassorbimento in questa patologia, dove possibili ulteriori alterazioni endocrinologiche associate potrebbero influenzare il metabolismo osseo.

092

CONFRONTO TRA I VALORI CIRCOLANTI DI INSULIN-LIKE FACTOR-I (IGF-I) E IGF BINDING PROTEIN 3 (IGFBP-3) NELLA VALUTAZIONE BIOCHIMICA IN PAZIENTI ACROMEGALICI ED IPOPITUITARICIG. Bugari¹, S. Bonadonna², I. Patelli², G. Mazziotti², M. Doga², L. Caimi¹, C. Iacobello¹, A. Giustina²¹*Dip. Diagnostica di Laboratorio, III Lab. Analisi Ormonologia-Tossicologia e Biotecnologie, A.O. Spedali Civili, Brescia*²*Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi, Brescia*

I dosaggi IGF-I e IGFBP3 sono strumenti essenziali nella valutazione diagnostica dei disordini dell'asse somatotropo nell'adulto, come acromegalia e ipopituitarismo.

Scopo dello studio era valutare l'utilità clinica del dosaggio IGFBP3, confrontandolo con quello di IGF-I in una popolazione di pazienti affetti da malattia ipofisaria.

I dosaggi IGF-I e IGFBP3 eseguiti su analizzatore Immulite 2000.

Sono stati valutati 9 pazienti ipopituitarici affetti da deficit di GH (GHD) dell'adulto e 22 pazienti acromegalici.

Nei pazienti con ipopituitarismo, il GHD era diagnosticato in base ai livelli di GH <3 ng/mL dopo stimolo.

Solo 4 dei 9 pazienti con GHD (44.4%) presentavano livelli IGF-I inferiori al range di normalità per sesso ed età; stessa frequenza (44.4%) per i livelli di IGFBP3 inferiori al range di normalità.

Per questi pazienti, IGFBP3 non correlava significativamente con IGF-I (r:0.56 p=NS).

13 dei 22 pazienti acromegalici avevano malattia attiva, in base ad elevati livelli circolanti di IGF-I rispetto al range di normalità per sesso ed età. Sorprendentemente solo 7 dei 13 pazienti con malattia attiva (53.8%) avevano valori di IGFBP3 sopra il range di normalità.

I pazienti con malattia attiva e valori di IGFBP3 superiori alla norma, presentavano valori di IGF-I mediamente più elevati rispetto ai pazienti con malattia attiva ma con valori normali di IGFBP3 (515 ng/mL vs 333 ng/mL).

Nella globalità della popolazione acromegalica, il coefficiente di correlazione tra IGF-I e IGFBP3 risultava 0.91 con p altamente significativa, p<0.001. Suddividendo pazienti acromegalici in ~attivi~e ~controllati~, la correlazione tra IGF-I e IGFBP3 si manteneva significativa solo nei pazienti ~attivi~(r:0.86 p<0.001), mentre nei pazienti ~controllati~la correlazione dei due parametri biochimici si riduceva divenendo non significativa (r:0.49 p=NS).

In conclusione IGFBP3 correla bene con IGF-I solo nei pazienti con acromegalia attiva; nel GHD il dosaggio IGFBP3 non ha alcun vantaggio rispetto ai noti limiti del dosaggio IGF-I.

Con gli attuali range di riferimento, il dosaggio IGFBP3 non è sufficientemente informativo per definire l'attività della malattia acromegalica.

Bibliografia

Giustina et al. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Feb;85(2):526-9

093

EFFECT OF CHRONIC GLUCOCORTICOID TREATMENT OF SPONTANEOUS PULSATILE PARATHYROID HORMONE SECRETION IN HUMANS

G. Bugari¹, S. Bonadonna², I. Patelli², M. Nuzzo², G. Mazziotti², J. D. Veldhuis³, L. Caimi¹, C. Iacobello¹, A. Giustina²

¹Dip. Diagnostica di Laboratorio, III Lab. Analisi Ormonologia-Tossicologia e Biotecnologie, A.O. Spedali Civili, Brescia

²Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi, Brescia

³Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

Parathyroid hormone (PTH) is spontaneously secreted in both tonic and pulsatile fashion. Glucocorticoids are widely used pharmacologic agents which cause a severe form of osteoporosis. While several data have been published on their effects on PTH expressed as a single random sample, it is not known how glucocorticoids might alter spontaneous PTH secretory dynamics.

The aim of our study was to evaluate spontaneous changes in serum PTH levels in six adult male patients (aged 31-64 years) receiving chronic (>6 months) therapy with glucocorticoids (daily dosage > 7.5 mg of prednisone) as compared with a control group of 10 age- and sex-matched normal subjects.

Peripheral venous blood sampling was performed every 3 min for 6 h from 09.00 to 15.00 h. All blood samples, for the quantitative measurement of intact parathyroid hormone, were analyzed by Immulite Analyzer (DPC product Corporation, Los Angeles CA -USA) involving a solid-phase, two site chemiluminescent enzyme- labelled immunometric assay.

Plasma PTH release profiles were subjected to deconvolution analysis, a method that resolves measured hormone concentrations into secretion and clearance components. In the glucocorticoid-treated group, the PTH tonic secretory rate was reduced (4.3±0.74 vs 8.8±1.4 pg/mL per min in controls, P=0.017). There was, however, an increase in the fractional pulsatile PTH secretion (42±8.2 vs 18.3±3.9 pg/mL per min, P=0.006) in glucocorticoid-treated vs normal subjects. Mean overall PTH concentration, as well as mean integrated area, was similar among normal and glucocorticoid-treated subjects. These results suggest that chronic glucocorticoid treatment induces a redistribution of spontaneous PTH secretory dynamics by reducing the amount released in tonic fashion and increasing the amount released as pulses. Clinical relevance of these findings to glucocorticoid reduced osteoporosis remains to be demonstrating.

References

Mazziotti G. et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. Trends Endocrinol Metab, 2006 May-Jun 17(4):144-9.

094

BASAL ALDOSTERONE-RENIN RATIO AND ALDOSTERONE LEVELS IN HEALTHY ADULTS DURING THE SALINE LOAD TEST

J. Kratzsch¹, D. Wende², J. Thiery¹, M. Banci³, R. Splendore³, C. Koch²

¹Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics

²Dep. of Internal Medicine III, University Hospital Leipzig

³DiaSorin S.p.A., Saluggia (VC), Italy

Following a positive screening test by the aldosterone/renin ratio (ARR), the diagnosis primary hyperaldosteronism is often confirmed with an iv saline load test (SLT). Our objective was to establish reference values and evaluate influencing factors for the basal aldosterone/renin ratio and for aldosterone levels during the SLT.

Sixty-five randomly selected healthy adults (age range, 23-69 years) underwent a SLT. We assessed plasma aldosterone (PAC, RIA, DiaSorin) and renin levels (PRC, LIAISON, DiaSorin) at 8.00 a.m. after 15 min rest in supine position and 12.00 a.m. after finishing the infusion of 2 L of NaCl. Reference intervals for ARR and aldosterone during SLT were calculated for the 5th-95th percentiles.

Median basal ARR was 61.5 (11.2-165) pmol/L / μIU/mL in females (n=31) and 22.0 (9.3-61.3) pmol/L / μIU/mL in males (n=34). Correlation analysis of ARR revealed a significant dependence on gender (r=-0.52; p<0.001), height (r=-0.33; p<0.01) and weight (r=-0.25; p<0.05) but no impact of age, smoking or oral contraceptives. Median aldosterone level decreased significantly during SLT from 468 (172-1000) pmol/L to 85 (10-183) pmol/L. RR did not significantly increase during the SLT but in those subjects in whom it did rise by maximal 10 mm Hg, diuresis occurred. Serum Na and K levels did not significantly change during the SLT.

We conclude that gender appears to be a significant influencing factor on the values of the aldosterone/renin ratio in healthy subjects. Blood pressure expectedly impacts diuresis and underscores those patients with severe hyperaldosteronism, heart or renal.

095

CARCINOMA DELLA MAMMELLA E TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA (HRT): EFFETTI "IN VITRO" DEL TIBOLONE E DEI SUOI METABOLITI SULLA CRESCITA DI CELLULE EPITELIALI MAMMARIE NON TRASFORMATE UMANE (MCF 10)

L. Postiglione¹, M. Paduano¹, F. Pollio², D. Carnevale¹, G. Varriale¹, M. De Falco², S. Salzano³, F. Ciociola², A. Di Lieto²

¹Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "Federico II" di Napoli

²Dip. di Scienze Ostetrico-ginecol. Urologiche e Medicina della Riproduzione, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "Federico II" di Napoli

³IEOS, Istituto di Endocrinologia e Oncologia (CNR), Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "Federico II" di Napoli

Introduzione. Il Tibolone, uno steroide sintetico con attività estrogenica, progestinica ed androgenica, è efficace nel trattamento dei disturbi del climaterio e nella prevenzione dell'osteoporosi post-menopausale(1). Durante il passaggio attraverso l'intestino e il fegato, questo composto è convertito dalla 3 α -idrossisteroide deidrogenasi (3 α HSD) e 3 β -idrossisteroide deidrogenasi (3 β HSD) rispettivamente nei suoi derivati 3 α -ridotto, 3 β -tibolone e Δ 4 isomero. A differenza del Tibolone, i suoi metaboliti legano numerosi recettori steroidei con alta affinità.

Materiali e metodi. Sono stati studiati gli effetti "in vitro" del Tibolone e dei suoi metaboliti su cellule MCF10, linea di cellule epiteliali mammarie non trasformate umane. Tali cellule sono state stimolate a diverse concentrazioni (0,01 μ M, 0,1 μ M e 1 μ M) con i composti studiati. La proliferazione cellulare è stata valutata dopo 24 e 48 ore; il ciclo cellulare e l'apoptosi sono stati studiati dopo stimolazione con i tre metaboliti alla concentrazione di 1 μ M.

Risultati. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione della proliferazione delle MCF10 dopo stimolazione con Tibolone (1 μ M) a 48 ore confrontato con i controlli. La stimolazione con 3 α -OH-tibolone e 3 β -OH-tibolone induce una diminuzione della proliferazione delle MCF10 sia a 24 che a 48 ore ad ogni concentrazione, rispetto ai controlli. Nessun effetto sulla proliferazione è stato osservato dopo la stimolazione con Δ 4-isomero.

L'analisi del ciclo cellulare delle MCF10, dopo la stimolazione sia con il Tibolone che con i suoi metaboliti (1 μ M), non mostra nessuna modificazione, rispetto ai controlli, nelle fasi G1 S e G2 + M, a tutti i tempi osservati. La stimolazione delle MCF10 contemporaneamente con Tibolone e i suoi metaboliti induce un effetto pro-apoptotico già a 9 e 12 ore.

Conclusioni. Questi dati iniziali suggeriscono che il Tibolone e i suoi metaboliti non influenzano la crescita delle MCF10, sebbene ulteriori esperimenti sono in corso per valutare altri effetti su possibili trasformazioni di tali cellule.

Bibliografia

1. Kloosterboer HJ. Tissue-selectivity: the mechanism of action of Tibolone. *Maturitas* 2004;48:S30-40.

096

MARCATORI ORMONALI DEL BITEST E SESSO DEL NASCITURO

M. Donato¹, F. Vascotto¹, G. D'Ottavio², G. Tamaro¹

¹Laboratorio d'Analisi, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste

²S.S.D. Ecografia Ostetrico-Ginecologica e Diagnosi Prenatale, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste

Il bitest è un test di screening che, in gravidanza, consente di stimare precocemente il rischio di trisomia 18 e trisomia 21 nel nascituro. Questo test considera anche i livelli, nel siero della gestante, della proteina plasmatica A associata alla gravidanza (PAPP-A) e della subunità beta libera della gonadotropina corionica umana (free beta-hCG), che spesso risultano alterati se il feto presenta una delle trisomie in questione. Per un'esatta stima del rischio, è necessario correggere i valori ottenuti dai dosaggi delle due molecole tenendo conto di alcuni fattori (elementi genetici e dello stile di vita e datazione della gravidanza) che ne influenzano i livelli serici. Ci proponiamo di valutare un'eventuale influenza del sesso del nascituro sui livelli della PAPP-A e della free beta-hCG nel siero materno tra la dodicesima e la quattordicesima settimana di gestazione.

Abbiamo considerato 317 gravidanze non complicate a feto singolo, concluse con la nascita di bambini vivi euploidi. In 162 di queste gravidanze il feto era di sesso maschile, in 155 femminile. In tutte queste gravidanze erano state dosate la PAPP-A e la free beta-hCG tra la dodicesima e la quattordicesima settimana di gestazione. I livelli della PAPP-A non differivano in modo significativo a seconda del sesso del nascituro, né se espressi in mU/L, né se espressi in multipli di mediana o multipli di mediana corretti. Le concentrazioni seriche della free beta-hCG in ng/ml erano tendenzialmente più alte nelle gravidanze con feto di sesso femminile ma, considerando i livelli del marker in multipli di mediana o in multipli di mediana corretti, non abbiamo osservato alcuna differenza statisticamente significativa.

Poiché, per stimare il rischio di trisomia 21 e trisomia 18 nel nascituro, il bitest considera i livelli dei marcatori ormonali espressi in multipli di mediana corretti, il sesso del nascituro non è da annoverare tra i fattori da considerare per una corretta esecuzione del test.

Bibliografia

Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson AM. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Health Technology Assessment* 2003;7(11):1-77.

097

A COMPARATIVE STUDY OF THE CHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY (CLIA) VS. THE ENZYMATIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF RENIN IN HUMAN PLASMA IN HYPERTENSIVE PATIENTS.

R. Splendore², C. Lonati¹, B. Gidaro¹, M. Garagiola¹, M. Banci², F. Garetto², G. Melzi d'Eril¹, A. Morganti¹

¹Hypertension Unit, Osp S. Paolo, Università di Milano, Milano, Italy

²DiaSorin S.p.A., Saluggia (VC), Italy

Background. Renin concentration is usually measured as plasma renin activity (PRA, ng/mL/h), defined as the ability of the enzyme to convert the substrate angiotensinogen into angiotensin I under controlled conditions. This enzymatic method has the limit to be time consuming and has a scarce interlaboratory reproducibility. Recently a new automated chemiluminescent immunoassay, which allows the direct quantification of immunoreactive renin in plasma (CLIA-R, μ IU/mL), has been developed.

Aim of the study. This study was aimed at assessing the clinical value of the LIAISON Direct Renin assay (DiaSorin, LSN) as a reliable alternative to PRA for the fast determination of renin.

Methods. Plasmatic Renin Activity (PRA), DiaSorin, REN-CTK

Chemiluminescent Immuno Assay for Direct Renin (CLIA-R), DiaSorin, LIAISON Direct Renin Aldosterone (A), DiaSorin, ALDO CTK-2

Results. Overall supine PRA and CLIA-R were respectively 1.2 ± 0.3 and 40 ± 11 and rose to 2.4 ± 0.4 and 59 ± 13 after standing ($p < 0.01$ for both), the supine and upright values obtained with the two methods being correlated ($r = 0.89$ and 0.92 respectively, $p < 0.01$ for both). In the 19 pts not on treatment with ACEIs or ARBs supine PRA and CLIA-R were respectively 0.7 ± 0.2 and 21 ± 6 and rose to 1.3 ± 0.4 and 32 ± 10 after standing, the r values of the correlations being 0.94 and 0.98 ($p < 0.01$). In these 19 pts plasma aldosterone (A, pg/ml) increased from 69 ± 14 to 155 ± 24 ($p < 0.01$) after standing and the changes in PRA and CLIA-R were both correlated with those in A ($r = 0.44$ and 0.51 , $p < 0.01$).

Conclusions. The CLIA-R seems to confirm its clinical reliability as a valid alternative to PRA for the fast determination of renin with a fully automated method on the LIAISON instrument.

This has been confirmed particularly in pts off treatment with ACEIs/ARBs in whom the CLIA-R results reflect, like PRA, the stimulating effects of renin on aldosterone.

However in this study the correlation between PRA/CLIA-R seems better for values in the intermediate-high range than for those in the low range. Further studies are ongoing to clarify this finding.

References

Immunoradiometric versus enzymatic renin assay: results of the Italian Multicenter Comparative Study. Morganti A. et al., *J. Hypert*, 1995, 13:19-26.

098

CLARITHOMYCIN RESISTANCE, TNF-A GENE POLYMORPHISM AND MUCOSAL INFLAMMATION AFFECT H. PYLORI ERADICATION SUCCESS

A. Stranges¹, C. Zambon², M. Fasolo¹, D. Basso¹, A. D'Odorico³, F. Navaglia¹, P. Fogar², E. Greco¹, S. Schiavon¹, A. Padoan¹, E. Fadi¹, G. Sturniolo³, M. Plebani¹, S. Pedrazzoli²

¹Department of Laboratory Medicine, University of Padova, Italy

²Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padova, Italy

³Department of Surgical and Gastroenterological Sciences, University of Padova, Italy

The success of triple therapy for *H. pylori* eradication is about 80%. Aims: ascertain the role of bacterial virulence genes (*cagA*, *vacA*), clarithromycin resistance (*ClrA*), host polymorphism of genes involved in PPI metabolism (*CYP2C19*) and in host immune response (*IFN γ* , *TNF α* , *IL1b*, *IL1RN*, *IL10*, *IL12*) in causing eradication failure. We selected 100 *H. pylori* infected patients (histology). All were PCA treated; eradication was evaluated by ¹³C-UBT. PCR was used to analyze: *cagA*, *vacA* s and m polymorphisms, five 23S rRNA mutations associated with *ClrA* and the following host SNPs were assayed: *IFN γ +874A>T*, *TNF α -1031T>C*, *TNF α -857C>T*, *TNF α -376G>A*, *TNF α -308G>A*, *TNF α -238G>A*, *IL1b-31C>T*, *IL1RN intron2 VNTR*, *IL10-1082A>G*, *IL10-819C>T*, *IL10-592C>A*, *IL12+6686G>A*, *IL12+15485A>C*, *CYP2C19-3402C>T*, *CYP2C19-806C>T*, *CYP2C19+681G>A*. Eradication failed in 45 cases. *ClrA* was found in 22/71 *H. pylori* strains. Treatment failure was significantly correlated with: *ClrA* ($\chi^2 = 10.8$, $p < 0.001$, all resistant strains were in non eradicated patients), *TNF α -238* (Fisher's exact test: $p < 0.05$), *IL10-819* ($\chi^2 = 9.0$, $p < 0.01$), *IL10-592* ($\chi^2 = 9.0$, $p < 0.01$) SNPs and with *IL10ATA/ATA* haplotype (Fisher's exact test: $p < 0.05$). With logistic regression analysis (eradication=dependent, *ClrA*, *TNF α -238* SNP and *IL10ATA/ATA*=covariates) only *ClrA* ($\text{Exp}(B) = 17939.8$, $95\% \text{CI} = 0.3-15E+33$) and *TNF α -238* SNP ($\text{Exp}(B) = 10.5$, $95\% \text{CI} = 1.06-105.0$) were significant. Among patients infected by *ClrS* strains, eradication correlated with: *TNF α -1031* ($\chi^2 = 8.5$, $p < 0.05$), *TNF α -238* (Fisher's exact test: $p < 0.05$) SNPs and with antral activity ($\chi^2 = 9.5$, $p < 0.01$). Logistic regression analysis (eradication=dependent; *TNF α -1031* and *-238* SNPs, and antral activity=covariates) allowed a correct classification of patients in 81.08% of the cases, only *TNF α -238* SNP ($\text{Exp}(B) = 32.8$, $95\% \text{CI} = 0.51-2089.9$) and antral activity ($\text{Exp}(B) = 0.22$, $95\% \text{CI} = 0.04-1.17$) being relevant. Conclusion: *H. pylori ClrA* is the main cause of eradication failure after PCA therapy; *CYP2C19* polymorphisms has a minor role while *TNF α -238* SNP affects eradication success, probably due to its involvement both in the control of gastric acid secretion and in the inflammatory response, the degree of which in antral mucosa influences eradication efficacy.

099

DOSAGGIO DI ETANOLO IN SOGGETTI COINVOLTI IN INCIDENTI STRADALI IN PROVINCIA DI BOLZANO NEL TRIENNIO 2004-2006A. Vodova¹, F. Rizza¹, G. Bortolameolli¹, A. Castellini¹, A. Spitaleri¹, D. Piccoli¹¹Settore di Farmacotossicologia, Lab. di Biochimica Clinica, Osp. di Bolzano

Introduzione. Nel periodo comprendente gli anni 2004 – 2006 sono stati richiesti al nostro servizio 543 dosaggi di alcool etilico da parte delle Forze dell'Ordine nella Provincia di Bolzano. Si è trattato di prelievi di sangue eseguiti su pazienti coinvolti in incidenti stradali. Lo scopo del lavoro è la valutazione statistica dell'incidenza dell'abuso dell'alcol nei conducenti degli autoveicoli coinvolti negli incidenti stradali.

Materiali e metodi. I campioni sono stati analizzati con due metodi: metodo REA (attenuazione dell'energia radiante) e con metodo gascromatografico a spazio di testa (metodo di riferimento internazionale).

Risultati. Di 543 soggetti il 63,5% sono risultati positivi. L'8,4% di questi è risultato essere di sesso femminile. Il valore più elevato è stato riscontrato in un soggetto maschile con 455 mg/dl di alcolemia.

E' stata valutata anche l'età dei pazienti risultati positivi. La categoria più numerosa è rappresentata da soggetti di età compresa tra 20 e 30 anni (31%). La situazione cambia radicalmente dopo i 50 anni quando la percentuale dei pazienti positivi si ferma intorno all'8%. La categoria dei neopatentati sotto i 20 anni conta 56 pazienti positivi (16%).

Considerando valori di alcolemia:

- tra 150 – 300 mg/dl, la categoria maggiormente interessata, risulta essere quella tra i 20 e 30 anni con 68 soggetti su 209 (32,5%)

- superiore a 300 mg/dl, si nota che la categoria maggiormente interessata risulta essere quella fra 50 e 60 anni.

Distribuzione dei soggetti risultati positivi nel dosaggio di alcol etilico secondo l'età

Valori di alcolemia in mg/dl	ETA'(Anni)					
	< 20	20 – 30	30 – 40	40 – 50	50 – 60	>60
50 - 150	26	39	19	13	7	10
150 - 300	29	68	54	34	8	16
sup. a 300	1	-	3	4	12	2
Totale	56	107	76	51	27	28

100

EFFETTO DI MONOMERI METILACRILICI SUL METABOLISMO OSSIDO-RIDUTTIVO DELLA LINEA CELLULARE MIELOIDE HL-60C. Callà¹, F. De Palma¹, A. Lupi², M. L. Gozzo¹, G. Nocca¹¹Ist. di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma²Ist. di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Roma

Monomeri metilacrilici quali il Butandiolo dimetilacrilato (BDDMA) ed il Diuretano dimetilacrilato (DUDMA) sono presenti in molte resine composite, auto- e foto-polimerizzabili, per uso odontoiatrico; queste molecole, a causa dell'incompletezza della reazione di polimerizzazione, sono parzialmente rilasciate nel cavo orale e – venendo a contatto con cellule di diversi tessuti dell'ospite – possono contribuire all'insorgenza di effetti indesiderati [W. Geurtsen].

Scopo di questo lavoro è stato lo studio degli effetti di BDDMA e DUDMA, a concentrazioni sub-citotossiche, sul consumo di ossigeno e sul metabolismo ossido-riduttivo della linea cellulare mieloide umana HL-60 valutando i seguenti parametri: a) respirazione cellulare (tramite ossigrafia con elettrodo di Clark) e b) stato redox della cellula (attraverso misura della concentrazione del glutatione ossidato e ridotto e dell'attività enzimatica di SOD e catalasi).

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule sia incubate con i monomeri metilacrilici che non trattate (controllo), utilizzando tempi diversi a seconda del parametro da osservare. I risultati sono stati espressi come media \pm SEM ed i gruppi di medie ottenuti sono stati comparati mediante analisi della varianza (ANOVA); un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Dai risultati ottenuti si ricava che il BDDMA ed il DUDMA inducono – nelle condizioni sperimentali utilizzate – una riduzione della velocità di consumo d'ossigeno che si ripercuote sullo stato redox della linea HL-60. Da quanto esposto risulta evidente l'importanza di un'approfondita valutazione biochimica dei meccanismi di citotossicità indotti da composti metilacrilici e la necessità di ulteriori studi per valutare le eventuali implicazioni cliniche.

Bibliografia

W. Geurtsen, F. Lehmann, W. Spahl, G. Leyhausen. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. Journal of Biomedical Materials Research 1998;41:474–80.

101

ZINC PROTOPORPHYRIN DETERMINATION IN CERAMIC PLANT WORKERS: A METHOD COMPARISON STUDYC. Rota¹, C. Canali¹, E. Cariani¹, T. Trenti¹¹Laboratorio di Tossicologia e Diagnostica Avanzata, Nuovo Ospedale S. Agostino Estense Baggiovara, Modena

In Western countries environmental lead concentrations have dramatically decreased during the last years but workplace exposure still remains a public health concern. In the Modena area several ceramic tile industries are present where lead is used in the painting process.

Blood lead level (BLL) is the main biological marker of lead exposure, but alone it is not a reliable indicator of prior, cumulative or chronic exposure. For this reason zinc protoporphyrin (ZnPP) is measured along with BLL. In fact lead inhibiting the Fe³⁺ reduction affects the introduction of Fe²⁺ into protoporphyrin IX (PP) that is then chelated by Zn²⁺ producing ZnPP. An increase of ZnPP is not detectable until BLL reaches 20-25 µg/dl followed by an exponential rise relative to BLL enhancement. The ZnPP increase lags behind a BLL increment but it lasts much longer. ZnPP increases also in iron deficiency and anemia of chronic disease.

In the present study blood samples from 63 ceramic tile plant employees have been analyzed. The measurement of ZnPP by hematofluorometer (HF) was compared with those from two isocratic HPLC methods, an in house method and a commercially available kit, in order to validate a method to be routinely used in our lab. BLL was also measured by atomic absorption.

Resulting blood lead levels were 7.26±4.46 µg/dl. ZnPP concentrations measured by HF were 17.75±5.6 µg/dl, while ZnPP levels measured by HPLC were 15.58±7.85 µg/dl when using the kit and 8.93±3.57 µg/dl when employing the in house method that showed lower extraction efficacy.

Positive correlation was found between HF and both HPLC kit and in house methods (r=0.52, p<0.0001 and r=0.49, p<0.0001 respectively) Strong correlation was also found between the two HPLC methods (r= 0.78, p<0.0001).

Both HPLC methods have demonstrated the presence of a sample with ZnPP concentration exceeding several times the average level, while HF did not.

HPLC methods are robust, reliable, can be easily automatized and are less subjected to interference than HF.

The commercially available HPLC kit meets the European Commission requirements, while other methods not. This method, with few modifications, can be employed to routinely analyze ZnPP in blood, its performances can be monitored by blood control samples.

102

DETERMINATION OF FATTY ACID ETHYL ESTERS IN MECONIUM BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRYE. Marchei¹, L. Di Cola¹, S. Pichini¹, M. Pellegrini¹, R. Pacifici¹, P. Zuccaro¹¹Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Alcoholism is a widespread social, medical and also economical problem. Consumption of alcohol during pregnancy is the cause of Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD), which affects approximately 1% of all live births. The adverse effects of ethanol in pregnancy are well described. To date most research on the prevalence of FASD comes from North America. Despite abundant alcohol consumption in Europe, the issue of maternal drinking is largely ignored.

It is of a great importance to have diagnostic tools (biological markers) to detect excessive alcohol consumption and alcoholism. Fatty acid ethyl esters (FAEE), a family of ethanol metabolites, have been proposed as biological markers of acute and chronic alcohol consumption. Recently, significantly elevated levels of FAEE have been documented in the meconium of neonates of mothers who had used alcohol heavily in pregnancy.

A procedure based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry is described for determination of FAEE in meconium. The analytes were extracted from the biological matrix by a solid/liquid extraction with aminopropyl columns. Chromatography was performed on a C8 reversed-phase column using water with 0.1% formic acid – acetonitrile- isopropilic alcohol (20/40/40, v/v/v) as a mobile phase at a flow rate of 0.7 ml/min. Separated analytes were determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry in the positive ion mode using multiple reaction monitoring. Limits of quantification were 50 ng/g for all analytes. Calibration curves were linear over the calibration ranges for all the substances under investigation, with a minimum r² > 0.99. At three concentrations spanning the linear dynamic range of the assay, mean recoveries from meconium ranged between 53.6 % and 96.6% for different analytes. These analytes were determined in meconium samples, already tested for the presence of opiates, cocaine, amphetamine derivatives, arecoline and cannabis.

References

Musshoff F, Daldrup TH, Determination of biological markers for alcohol abuse, *Journal of Chromatography B* 1998;713;245-264.

García-Algar O, Kulaga V, Gareri J, Koren G, Vall O, Zuccaro P, Pichini S, Alarming Prevalence of Fetal Alcohol, *European Journal of Pediatrics* (in Press)

103

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UNA METODOLOGIA LC/MS PER L'ANALISI DEL METILFENIDATO NELLA MATRICE CHERATINICA

E. Marchei¹, S. Pichini¹, R. Pacifici¹, M. Pellegrini¹, P. Zuccaro¹

¹Dipartimento del Farmaco, Reparto Farmacodipendenza Tossicodipendenza e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il metilfenidato (MPH) appartiene al gruppo dei farmaci noti come stimolanti del sistema nervoso centrale ed è utilizzato nel trattamento di pazienti affetti da disturbi dell'attenzione con o senza iperattività (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD) e da narcolessia (incontrollabile desiderio di dormire o improvvisi attacchi di sonno profondo).

Il monitoraggio e il controllo del consumo di farmaci nella popolazione pediatrica è più difficile da effettuare che negli adulti a causa della necessità di prelievi non invasivi o meno invasivi. Poiché nei bambini, come negli adulti, i campioni di capelli possono essere raccolti facilmente senza creare disagi al paziente, l'analisi nei capelli del MPH potrebbe essere un'alternativa per valutare l'esposizione cronica al farmaco.

Recentemente è stato messo a punto un metodo per la determinazione, in cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa, del MPH nei capelli di ragazzi ed adolescenti trattati con farmaci per la cura dell'ADHD.

Abbiamo analizzato i campioni di 21 pazienti tratti con diverse dosi in un periodo che va dai sei mesi ai 24. I primi risultati mostrano una concentrazione di MPH nei capelli che varia da 0,15 a 4,17 ng/mg di capelli. Si è inoltre osservato che la concentrazione diminuisce nei segmenti distali dei capelli, anche in bambini che sono trattati con la stessa dose di MPH nello stesso periodo. Questo fatto ha potuto essere attribuito allo shunt del sudore o del sebo con la degradazione di segmento o della droga dei capelli più prossimale dai trattamenti cosmetici nei segmenti più distali

Bibliografia

Marchei E, Muñoz JA, García-Algar O, Pellegrini M, Vall O, Zucca P, Piccini S, Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of methylphenidate, Forensic Science International (in Press)

104

VALUTAZIONE ANALITICA DEL METODO DIMENSION RXL PER IL DOSAGGIO DEL TACROLIMUS E STUDIO DI COMPARAZIONE CON IL METODO VIVA

T. Iacobellis¹, V. Rosato¹, P. Valentino¹, I. Specchia¹, G. Gassi¹, P. Mastrolonardo¹, F. Catacchio¹, F. Di Serio¹

¹U.O. Patologia Clinica Policlinico di Bari

Scopo. Il Tacrolimus è un potente immunosoppressore. La letteratura indica come i metodi disponibili per l'analisi del Tacrolimus possono fornire risultati assai diversi, tenendo conto dell'importanza del monitoraggio del Tacrolimus (range terapeutico 5-20 ng/ml) per evitare insuccessi terapeutici o intossicazioni gravi. Il nostro scopo era di valutare la correlazione e concordanza di due strumenti, uno semiautomatico Viva e uno completamente automatico Dimension entrambi della Dade-Behring.

Materiali e Metodi. 50 pazienti (25 maschi e 25 femmine) sottoposti a trapianto di rene. Precisione e sensibilità funzionale del metodo sono state valutate in accordo con le linee guida NCCL EP5-A e EP6-A. La linearità è stata valutata usando i calibratori di livello 5 (32,5 ng/ml) e 0, i dati analizzati utilizzando il metodo di regressione lineare. Il metodo Dimension è stato comparato (NCCL EP9-A) con il metodo di riferimento. I 50 campioni testati sul Dimension: media 10,5 ng/ml DS 5,4; Viva: media 10,9 DS 6,3.

Risultati. Studio di precisione: 4 determinazioni per 15 giorni consecutivi: CQ1 media 4,4 ng/ml CV%=5,2; CQ2 media 13,9 ng/ml CV%=4,3; CQ3 media 25,6 ng/ml CV%=2,6; Pool media 11,5 ng/ml CV%=2,5.

Sensibilità analitica. Il limite di misura del metodo calcolato come il valore medio più 3 DS di 15 replicati del calibratore 0 era di 0,6 ng/ml. Sensibilità funzionale: le più basse concentrazioni con un CV=al 10% e 20% erano 2,5 e 1,6 ng/ml.

Linearità. Pendenza 1,03 e intercetta 0,43 indicano che il test è lineare da 1,2 a 30 ng/ml entro una differenza massima misurata del 12% in questo intervallo di valori.

Confronto tra metodi. La retta di regressione $Y(\text{Dimension})=0,94 \times (Viva)+0,22, R^2=0,951$. Il plot di Bland-Altman ha mostrato il seguente bias medio (intervallo di confidenza al 95%) Viva-Dimension=0,20 (0,18-0,22).

Conclusioni. Le caratteristiche strumentali e analitiche di un sistema automatizzato, fanno sì che il Dimension RXL sia ottimale nella pratica clinica per il monitoraggio del Tacrolimus in pazienti trapiantati.

105

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI SIROLIMUS SU ABBOTT ARCHITECT i2000SRG. Mengozzi¹, C. Galli², S. Betteto¹, R. Ghignone¹, C. Cappelli¹, G. Priolo¹, C. Aldrighetti², G. Aimo¹¹Laboratorio Centrale "Baldi e Riberi", Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista, Torino²Abbott Diagnostici, Roma

Obiettivi. Valutare un nuovo dosaggio immunometrico competitivo per la determinazione quantitativa dei livelli di Sirolimus (Rapamicina) sul sistema automatizzato per immunochimica Abbott Architect i2000SR, verificandone sia le performances analitiche che la correlazione con il metodo commerciale impiegato in routine.

Metodi. a) Caratteristiche analitiche: l'imprecisione è stata valutata su tre livelli di controllo (range di concentrazione da 3,5 a 22,5 ng/mL) di due aziende diverse (Abbott e Bio-Rad) in base ad un protocollo CLSI (due repliche due volte al giorno per 5 giorni); la sensibilità funzionale (concentrazione con un CV totale del 20%) è stata verificata mediante analisi in doppio per 10 giorni di un pannello di sei campioni a concentrazione scalare da 3,0 a 0,5 ng/mL. b) Correlazione: sono stati analizzati in parallelo con il test in uso (Abbott IMx Sirolimus) 146 campioni, di cui 66 freschi e 80 conservati a -20°C. La casistica era composta da 57 donne (età media 54,3+11,0 anni, mediana 57, range 27-70) e 89 uomini (età media 52,5+12,9 anni, mediana 55, range 27-78). Tutti i campioni tranne uno (fresco, trapianto di cuore) erano stati ottenuti da pazienti sottoposti a trapianto di rene.

Risultati. L'imprecisione (CV totali) del test Architect Sirolimus variava dal 3,82% al 5,49% sui controlli Architect e dal 4,02% al 4,86% sui controlli Bio-Rad, la sensibilità funzionale era di 0,67 ng/mL. Il confronto con IMx ha evidenziato un grado elevato di correlazione ($r=0,961$), sia nei campioni freschi ($r=0,966$) che congelati ($r=0,974$). L'analisi delle differenze mostrava un lievissimo "bias" positivo del test Architect, costante per tutto il range di linearità dei due test.

Discussione. Le caratteristiche analitiche del dosaggio Architect Sirolimus sono apparse adeguate ad un impiego in routine, in accordo con quanto recentemente segnalato (1). La metodica comporta una fase estrattiva da sangue intero che poco si diversifica da quella precedentemente impiegata, mentre la misurazione completamente automatizzata offre dei vantaggi operativi.

Bibliografia

1. R.W. Schmidt, J. Lotz, R. et al. Analytical Multi-site evaluation of the Abbott Architect Sirolimus assay. Clin Chem Lab Med 2007; 45 (SS): S205.

106

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI TACROLIMUS SU ABBOTT ARCHITECT i2000SRG. Mengozzi¹, C. Galli², R. Ghignone¹, S. Betteto¹, C. Baldi¹, G. Martinasso¹, C. Aldrighetti², G. Aimo¹¹Laboratorio Centrale "Baldi e Riberi", Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista, Torino²Abbott Diagnostici, Roma

Obiettivi. Valutare un nuovo dosaggio immunometrico competitivo per la determinazione quantitativa dei livelli di Tacrolimus (FK 506) sul sistema automatizzato per immunochimica Abbott Architect i2000SR, verificandone sia le performances analitiche che la correlazione con il metodo commerciale impiegato in routine.

Metodi. a) Caratteristiche analitiche: la imprecisione è stata valutata su tre livelli di controllo Bio-Rad (range di concentrazione da 3,3 a 18,4 ng/mL), in base ad un protocollo CLSI (2 repliche 2 volte al giorno per 5 giorni); la sensibilità funzionale (concentrazione con un CV totale del 20%) è stata verificata mediante analisi in doppio per 10 giorni di un pannello di sei campioni a concentrazione scalare da 3,2 a 0,55 ng/mL. b) Correlazione: sono stati analizzati in parallelo con il test in uso (Dade Behring Viva) 120 campioni, di cui 60 freschi e 60 conservati a -20°C. I 60 campioni freschi provenivano da 24 femmine e 36 maschi (età media 51,3+13,5 anni, mediana 54, range 6-68), in prevalenza sottoposti a trapianto di rene (28 casi) o di fegato (19 casi). I 60 campioni congelati erano stati ottenuti da 6 soggetti sottoposti a trapianto di rene.

Risultati. L'imprecisione (CV totale) del test Architect Tacrolimus variava dal 4,88% al 5,36%; la sensibilità funzionale era <0,7 ng/mL. Il confronto con Viva ha evidenziato un alto grado di correlazione ($r=0,973$), sia per i campioni freschi ($r=0,971$) che congelati ($r=0,973$). L'analisi delle differenze mostrava un "bias" negativo del test Architect (media: -20,3%), con andamento modicamente proporzionale nell'ambito del range di linearità dei due dosaggi.

Discussione. Le caratteristiche analitiche del dosaggio Architect Tacrolimus sono apparse adeguate ad un impiego in routine, in accordo con quanto recentemente segnalato (1). La metodica comporta una fase estrattiva da sangue intero che non si diversifica da quella precedentemente impiegata, mentre la misurazione completamente automatizzata offre dei vantaggi operativi.

Bibliografia

1. P. Wallemacq, J. Goffinet, S. O'Morchoe et al. Analytical Multi-site evaluation of the Abbott Architect Tacrolimus assay. Clin Chem Lab Med 2007; 45 (SS): S205.

107

SURFACE-ACTIVATED CHEMICAL IONIZATION FOR THE ANALYSIS OF TACROLIMUS AND CYCLOSPORINE IN WHOLE BLOOD

M. Brambilla¹, E. Gonella¹, P. M. Gerthoux², M. Bertona¹, P. Mocarelli¹, P. Brambilla¹

¹University Department of Laboratory Medicine, Hospital of Desio, Desio, Milano

²Clinical Biochemistry Laboratory, Hospital of Sesto San Giovanni, Sesto San Giovanni, Milano

Introduction. Surface-Activated Chemical Ionization (SACI), already used for the analysis of Tacrolimus in whole blood samples, was investigated for another immunosuppressant, Cyclosporine A, in the same matrix.

Aim. The purpose was to apply the high flow gradient LC-SACI-MS³ approach, used for Tacrolimus analysis, for simultaneous determination of Cyclosporine A, with the same pre-treatment procedure and same analytical conditions. It allowed determination of two drugs in one analytical procedure, with reduction in analysis time and cost.

Methods. 20 different blood samples were treated with CH₃CN in order to precipitate proteins, then were centrifuged and supernatant was recovered. Ascomycin was used as internal standard for both compounds. To quantitate these immunosuppressants, calibration curves were built using the same six standard blood samples, with a Tacrolimus concentration of 2.1, 5.6, 10.9, 15.8, 21.9, 38.8 ng/mL and with a Cyclosporine A concentration of 46.7, 115, 304, 403, 777, 1937 ng/mL. The same four whole blood quality controls were used for both compounds. For Cyclosporine A the data were compared with those achieved using immunoassay technique.

RESULTS: The R² of Cyclosporine A calibration curve was in the range of 0.9926-0.9979. The R² of Tacrolimus calibration curve was in the range of 0.9979-0.9996. The percent trueness error for Cyclosporine A, in relationship to the immunoassay data, was between 0.4 - 6.2%. The 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.

Conclusions. The LC-SACI-MS³ approach allowed sensitive and selective simultaneous determination of these two immunosuppressive drugs in whole blood, with common and simple pretreatment procedure, so contributing to further simplification of therapeutic drug monitoring.

References

M.J. Bogusz et al. "Simultaneous LC-MS-MS determination of cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus in whole blood as well as mycophenolic acid in plasma using common pretreatment procedure", *Journal of Chromatography B, Biomedical sciences and applications*, 2007, 850(1-2):471-480

108

SURFACE-ACTIVATED CHEMICAL IONIZATION FOR THE ANALYSIS OF COCAINE AND BENZOYLECGONINE IN HAIR

M. Brambilla¹, E. Gonella¹, P. M. Gerthoux², M. Bertona¹, P. Mocarelli¹, P. Brambilla¹

¹University Department of Laboratory Medicine, Hospital of Desio, Milano

²Clinical Biochemistry Laboratory, Hospital of Sesto San Giovanni, Milano

Introduction. Surface-Activated Chemical Ionization (SACI) was employed for the analysis of cocaine and its metabolite, benzoylecgonine, extracted from hair.

Aim. The ability of the highly sensitive LC-SACI-MS³-SRM technique was used to analyse the presence of these diluted compounds in hair samples extracts, without the SPE pre-purification and concentration steps, in order to increase the sensitivity and decrease analysis time and cost.

Methods. Hair samples (20-50 mg each) were provided from 40 drug addicted subjects, washed with different solvents and cut with scissors. The samples spiked with 10 µL of a 2.0 ng/mL solution of deuterated internal standard (benzoylecgonine D3) were subjected to acid hydrolysis at 45°C for 18 hours. These solutions were diluted 1:10 with distilled water and directly analysed by LC-SACI-MS approach. Nine different negative control hair extract samples were mixed with cocaine and benzoylecgonine for a final concentration of 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 25, 50, 100 ng/mL to obtain calibration curves. The data were compared with those achieved using GC-MS technique. To evaluate the absence of the matrix effect, 15 drug-spiked negative hair extracts were analysed.

Results. The R² of the calibration curve was in the range of 0.9887-0.9980 for cocaine and 0.9987-0.9997 for benzoylecgonine. The LOD was 0.003 ng/mg hair for cocaine and 0.02 ng/mg hair for benzoylecgonine. The LOQ was 0.01 ng/mg hair for cocaine and 0.04 ng/mg hair for benzoylecgonine. The percent accuracy error, in relationship to the GC-MS data, was between 2-5% for both compounds.

Conclusions. The LC-SACI-MS approach was capable of detecting and measuring the quantity of cocaine and its metabolite benzoylecgonine in diluted extracts of hydrolysed hair samples with high sensitivity and selectivity, thus avoiding the SPE pre-purification and concentration steps.

References

Cristoni et al. "Surface-Activated Chemical Ionization Ion Trap Mass Spectrometry for the analysis of cocaine and benzoylecgonine in hair after extraction and sample dilution", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, in press

109

ADULTERAZIONE DEL CAMPIONE URINARIO: METADONE AGGIUNTOM. Filocamo¹, M. Tura¹, C. Arlotti¹, D. Casali¹, F. Peruzzi¹, S. Szymczuk¹, J. Bassani¹, S. Moroni¹¹Medicina di Laboratorio Ospedale Infermi Rimini

Il laboratorio riveste un ruolo importante nel programma di disassuefazione e riabilitazione delle dipendenze da sostanze d'abuso: i pazienti del Ser.T sono sottoposti a monitoraggio del metadone allo scopo di confermare il percorso terapeutico intrapreso, soprattutto nei pazienti con affidamento domiciliare del farmaco.

Il metadone assunto per via orale, viene metabolizzato a livello epatico ed escreto nelle urine in parte come sostanza madre e in parte sotto forma del suo principale metabolita 2 ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP).

Il monitoraggio viene eseguito nel nostro centro esclusivamente su campione biologico urina (matrice facilmente soggetta ad adulterazione), con metodo immunochimico EMIT II plus su strumentazione automatica ARX Dimension (Dade Behring); successivamente sui campioni positivi si esegue la ricerca dei metaboliti con metodo cromatografico.

Nel 2005 abbiamo analizzato 2237 campioni urinari per la ricerca del metadone (test di screening); di questi 1096 (pari al 49%) sono risultati positivi ed è stata eseguita la ricerca del metabolita EDDP con metodo cromatografico: 44 campioni (4%) hanno presentato livelli non rilevabili di EDDP.

Nel 2006 i campioni analizzati con test di screening sono stati 2709 di cui 1375 (50.7%) positivi: 13 campioni (pari al 0.94%) hanno presentato livelli non rilevabili di EDDP.

Dai nostri dati si evince che alcuni pazienti simulano il rispetto del programma terapeutico, eludendo i controlli, con aggiunta di piccole quantità di metadone ad urina drug free, nel tentativo di far risultare positivo il campione al test immunometrico senza aver assunto il farmaco.

E' evidente l'importanza dell'approccio analitico al fine di evidenziare le adulterazioni. Per ottimizzare i costi sarebbe utile sostituire il test immunochimico per la ricerca del metadone con un test immunochimico per la ricerca dei metaboliti.

Bibliografia

Dosage de l'EDDP urinaire (métabolite de la méthadone) par une méthode CEDIA.

Intérêt dans le suivi des patients sous traitement méthadone.

Annales de toxicologie analytique, Vol XIV, 2002, n°2, Isabelle Denis, Martine Roubille, Bernard Poggi, Fafia Djardem, Christian Trepo.

110

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT): VARIANTI GENETICHEM. Filocamo¹, M. Tura¹, C. Arlotti¹, D. Casali¹, F. Peruzzi¹, S. Szymczuk¹, J. Bassani¹, S. Moroni¹¹Medicina di Laboratorio Ospedale Infermi Rimini

La transferrina carboidrato carente (CDT) è un marcatore di abuso alcolico cronico, utilizzato nella nostra realtà nel protocollo per la idoneità alla guida in seguito alla sospensione della patente per violazione dell'art.186 del Codice della Strada. Questo dosaggio contribuisce alla formulazione del giudizio di idoneità alla guida da parte delle Commissioni Medico Locali; pertanto è evidente l'importanza di avere un dato affidabile e sicuro. Le varianti genetiche della transferrina possono interferire nella determinazione della CDT se viene eseguita con metodi che non separano le diverse isoforme.

Nel nostro laboratorio fino al 2004 la determinazione della CDT era eseguita con metodo immunochimico eterogeneo con separazione in colonna seguita dalla misurazione della quantità di transferrina carboidrato carente in proporzione alla transferrina totale (%CDT TIA version Standard, kit commercializzato dalla ditta Bio-Rad). Tale metodo non è in grado di rilevare le varianti genetiche che possono, come nel caso di variante genetica D, dare risultati di falsa positività.

Nel 2005 è stato sostituito con un metodo in cromatografia liquida ad elevata risoluzione (HPLC) su colonne a scambio anionico, con rivelazione per assorbimento UV a 460 nm, su sistema Agilent 1100 (%CDT by HPLC, kit della ditta Bio-Rad), in grado di rilevare le varianti genetiche, dovute a sostituzione di amminoacidi nella catena polipeptidica.

In due anni sono stati analizzati 4900 campioni, dei quali lo 0.57% presentava una variante genetica, nella nostra esperienza dei 28 pazienti che presentavano varianti genetiche, 13 si possono ricondurre alla forma eterozigote B e 15 alla forma eterozigote D: in questi casi non è possibile una determinazione esatta della CDT. Rivestendo il dato analitico una enorme importanza in ambito medico legale, si è cercato di adottare una metodo che aumenti la performance diagnostica migliorandone sensibilità e specificità a garanzia di un processo affidabile ed accurato.

Validazione di una metodologia di lavoro per la determinazione della transferrina carboidrato carente

Bibliografia

Casali D., Filocamo M. e al. Biochimica Clinica vol 29 n.2,2005

111

WATCHING PATH (CATENA DI CUSTODIA) FOR BIOLOGICAL SAMPLES. AN EASY AND LEGAL WAY TO GUARANTEE THE PATIENT AND THE HEALTH OPERATORS

M. Scorretti¹, C. Papetti¹, V. Esposito¹, B. Viva¹, G. M. Lagravinese¹

¹UOSD-Laboratorio di Emergenza, Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Roma

Since from december 2006 in the Stat Laboratory of our Hospital is operating a procedure that has been defined "Watching Path" (Catena di Custodia) for biological samples. Such a procedure is oriented to collect, preserve and store, legally, blood and urine samples from patients arrived in ER that need to be checked for toxicological tests. Most part of the toxicological tests are requested directly from police or law authority and are not strictly related with the clinical conditions of the patients. Once that laboratory results are available a copy of them is sent to the police. The Codice della Strada (Road Laws) (D. Lgs. 285-1992) at the articles 186 and 187 establish that the toxicological tests have to be performed in a public health service wich represent the legal way to guarantee the best practice of the entire procedure followed. Initially in this project have been included only those patients arrived in ER for crash accidents, wounded of firearms and in every clinical situations wich the ER medical staff decide to request the toxicological tests in relation with anamnestic data. In six months of activity we collected 90 biological samples (blood and urine) from patients arrived in ER. All samples have been recorded in dedicated files and stored in a closed refrigerator set at -20°C. The continuity in checking of the biological samples collected is assured by the supervision of an unique health operator that is responsible for the entire procedure, beginning with the blood or urine collecting and ending with the storage of the samples in a secure and controlled area. The samples collected will be stored at least for 365 days. Just recently the procedure has been extended to the pediatric Emergency Room.

112

PROCEDURA PER LA DETERMINAZIONE DELL'ETANOLEMIA SU SANGUE PERIFERICO SECONDO I PROTOCOLLI OPERATIVI DELL'ART. 186 DEL NUOVO CODICE DELLA STRADA

M. L. Capuano¹, E. Bruzzi¹, G. Gaetani¹, A. Cundari¹, A. Neri¹, R. Carrozza¹

¹Lab. Analisi Chimico-Cliniche e microbiologiche Osp. di Viterbo ASL Viterbo

Scopo. Il presente studio valuta l'andamento dei risultati dell'etanolemia dei campioni inviati dal Pronto Soccorso delle ASL di Viterbo. Le procedure analitiche e di raccolta seguono il protocollo operativo emanato congiuntamente dai Ministeri della Salute, Interno e Trasporti. In tal modo possono essere monitorate la popolazione e le situazioni a rischio secondo quanto definito dalla vigente normativa. Materiali e metodi. La determinazione dell'etanolemia viene effettuata su campioni di sangue intero prelevato secondo il protocollo specifico. Il metodo considerato il golden standard prevede l'uso del GC come strumento di determinazione. La certezza tecnica del superamento del tasso legale di 0.5 g/l di alcool etilico nel sangue è ottenibile, infatti, solo mediante dosaggio gas-cromatografico in spazio di testa dell'etanolo. Nel nostro laboratorio viene utilizzato il gas-cromatografo tipo CLARUS 500, ed il campionatore di spazio di testa TURBOMATRIX 40 con annesso generatore di idrogeno della Perkin Elmer. La colonna analitica è una ELITE-BAC 1, e lo standard interno è l'isopropanolo in isoterma a 60 °C. Il metodo prevede oltre la determinazione dell'etanolemia nei campioni, anche l'esecuzione di controlli interni (MEDIDRUG ETHANOL S-plus della MEDICHEM) e la V.E.Q. dell'ospedale Careggi di Firenze. Risultati. Nel 2006, anno di sperimentazione della procedura, sono pervenuti al nostro laboratorio 118 campioni richiesti dall'autorità giudiziaria, di cui sono risultati positivi 38 (32%), dei quali il 16 % con un valore compreso tra 0.5 e 1 g/l, il 59% tra 1 e 2 g/l ed il 25% > 2 g/l.

Conclusioni. In tema di sicurezza stradale e di corretta individuazione dell'abuso di alcol, la procedura adottata nel nostro laboratorio garantisce l'affidabilità del dato, sia dal punto di vista analitico che riguardo la catena di custodia, con conseguente garanzia dei diritti della difesa e attendibilità del dato dal punto di vista medico legale. Quanto sopra permette all'autorità giudiziaria di formulare un "giusto giudizio", consentendo secondo le intenzioni del legislatore la salvaguardia della salute sia del singolo che della collettività.

Bibliografia

Macchia T., Mancinelli R. Dell'Utri A. et al. Boll. Medici Italiani dei Trasporti 1991;2:5-19

113

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI LEVETIRACETAM E SUO INTERVALLO TERAPEUTICOP. Pigni¹, A. Calcinari¹, G. Coppa¹, A. M. Margarucci Gambini¹, M. Tocchini¹¹Lab. Analisi Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I, Lancisi, Salesi -Ancona

Il Levetiracetam (LEV), l'S-enantiomero dell' α -etil-2-oxo-1-pirolidina acetamide è un nuovo farmaco antiepilettico (AED) non correlato strutturalmente agli altri antiepilettici esistenti. Si è dimostrato efficace nella terapia di pazienti con crisi parziali con o senza generalizzazione secondaria farmaco-resistenti sia in trattamento aggiuntivo che in monoterapia. L'obiettivo che ci siamo proposti è la determinazione delle concentrazioni plasmatiche di LEV e l'individuazione di un intervallo terapeutico di maggior efficacia nel controllo della terapia e di un minor rischio di effetti indesiderati. Il metodo utilizzato per la determinazione dei livelli plasmatici prevede, dopo aggiunta ai calibratori e ai campioni di uno standard interno (adenosina), la deproteinizzazione del plasma/siero. L'analisi viene eseguita in HPLC con colonna C18 5 μ 4,6x150 mm, fase mobile: 890 ml tampone fosfato 3mM pH 6,60ml MeOH, 50ml ACN, 0,5ml TEA, flusso 1 ml/min; l'eluato è monitorato a 205 nm (1). Il tempo di eluzione è 12min. Nel metodo sviluppato il recupero di LEV è del 100.6% e le risposte analitiche sono lineari dal limite più basso di sensibilità di 0.05 μ g/ml a 50 μ g/ml. Sono stati monitorati 40 pazienti di età 7 mesi-68 anni in terapia con LEV associato ad altri antiepilettici; 20 di questi pazienti sono stati sottoposti ad un ulteriore prelievo dopo 5-6ore dall'assunzione del farmaco. Sono stati inoltre valutati i rapporti e le correlazioni Dose/Livello nei pazienti di età <14 anni e in quelli >14 anni.

Conclusioni. Il metodo semplice, sensibile, riproducibile utilizza solo 200 μ l di plasma/siero. Nel nostro campione di pazienti è stato possibile individuare un intervallo terapeutico (7-23 μ g/ml), associato all'efficacia di LEV, più ristretto rispetto a quello di altri studi condotti su pazienti in mono o in politerapia. Dal nostro studio è emersa una scarsa correlazione tra dose e livello in particolare nella fascia di età tra 0-14anni, ciò conferma la necessità di monitorare questo farmaco presentato come un composto dal profilo farmacocinetico così lineare e con scarsa variabilità intra ed interindividuale, da poter predire i livelli dalla dose orale (mg/Kg/die).

Bibliografia

1. Pucci V et al, HPLC determination of Levetiracetam. *Biomedical Chromatography*. 18:37-44,2004

114

UTILIZZO DI UN TEST ELISA AD ALTA AVIDITA' ANTICORPALE PER IL DOSAGGIO DEGLI ANTICORPI ANTI DNA NATIVO (FARRZYME): VALUTAZIONI SUL SIGNIFICATO CLINICO IN SOGGETTI AFFETTI DA LESA. Bianco², L. Grassia¹, C. Galano¹, L. Scarso³, F. Minetti²¹Lab. di Immunopatologia, A. O. Osp. S. Martino, Genova²Lab. Patologia Clinica, ASL2 Savonese, Savona³Centro di Immunoematologia e Trasfusionale, Ist. G.Gaslini, Genova

La presenza degli anticorpi anti dsDNA è uno dei criteri ACR per la diagnosi di LES. La positività è diversa a seconda del momento diagnostico in cui viene rilevata (60% nel LES attivo, 80-90% in soggetti con nefropatia, 25% nel LES quiescente). Uno dei punti cruciali del dosaggio degli antiDNA nativo è quello di poter disporre di un test che sia in grado di rilevare in modo corretto tutte le fasi di patologia presenti nel LES (quiescenza, riacutizzazione, attività, remissione). Non tutti i test diagnostici a disposizione rispondono a caratteristiche di sensibilità e specificità simili: è noto che il Test di Farr in RIA ha una alta specificità mentre il test in immunofluorescenza su *Crithidia Luciliae* (CLIFT) possiede una alta sensibilità. I tests in ELISA finora a disposizione del mercato hanno dato buoni risultati senza però raggiungere le performance di un test di Farr. Ciò è dovuto soprattutto a difficoltà metodologiche (denaturazione del coating antigenico, false positività), pertanto si continua a definire "Gold Standard" per la sua alta avidità il test di Farr e per la sua alta sensibilità il CLIFT.

Scopo di questo studio è quello di confrontare il Kit ELISA Farrzyme (Binding Site, UK) con il CLIFT (testato in doppio cieco da due diversi operatori e con due differenti kit IFA - AIPhadia, Alifax e Euroimmun). Il kit rileva anticorpi anti DNA ad alta avidità così come il test di Farr classico.

115

PANCREATIC CANCER (PC) PULLS DOWN LYMPHOCYTE MIGRATION

E. Fadi¹, P. Fogar², C. Mazzon³, E. Greco¹, T. Kasic³, F. Navaglia¹, C. Zambon², A. Viola³, S. Schiavon¹, S. Pedrazzoli², M. Plebani¹, D. Basso¹

¹Department of Laboratory Medicine, University of Padova, Italy

²Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padova, Italy

³Venetian Institute of Molecular Medicine and Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Italy

Introduction. Tumor cells may neutralize the immune system by evading detection and/or by inhibiting immune cells function. To test this latter hypothesis we verified in vitro whether PC cells conditioned media modify CD4+ T cell proliferation, migration and activation. **Methods.** CD4+ cells were cultured for 4 days in control or Capan1 (a PC cell line) fresh conditioned media. To assess migration a transwell system with or without hSDF α was used; migrating cells were FACS counted. Proliferation was FACS analysed using carboxyfluorescein succinimidyl ester as tracer, after 72 hrs of co-culture with allogenic PBMC. Control and conditioned CD4+ cells were co-cultured for 24 hrs with unpulsed or staphylococcal enterotoxins pulsed EBV-B cells. In the supernatants interferon- γ (IFN- γ) and IL4 were assayed.

Results. The number of control and conditioned migrating CD4+ T cells did not differ in the absence of hSDF α (t=1.0, p:ns). In the presence of hSDF α , migrating Capan1 conditioned lymphocytes were less (3337 \pm 390, mean \pm SEM) than control lymphocytes (6413 \pm 660) (t=7.55, p<0.001). Capan1 conditioned medium stimulated CD4+ T cell proliferation both in the presence (t=2.27, p<0.05) or absence (t=3.87, p<0.001) of allogenic PBMC. IL4 concentration did not significantly vary between conditioned or non conditioned EBV-B stimulated CD4+ cells. Stimulation of CD4+ T cells by pulsed or unpulsed EBV-B induced higher IFN- γ concentrations in conditioned than in control cells (t=3.30, p<0.05 and t=2.56, p<0.05 respectively).

Conclusions. We demonstrated that PC cells release soluble mediator/s which inhibits CD4+ T cell migration, activates proliferation and Th1 differentiation, supporting the hypothesis that pancreatic tumor cells alter immune cells function.

116

ANTICORPI ANTI-PEPTIDE CICLICO CITRULLINATO (ANTI-CCP) IN UN GRUPPO DI PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE HCV-CORRELATA

L. Postiglione¹, G. Tarantino², A. Spanò², P. Ladogana¹, F. L. Perrone¹, G. Di Spigna¹, A. Riccio²

¹Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Facoltà di Medicina e chirurgia, Università "Federico II" di Napoli

²Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Facoltà di medicina e Chirurgia, Università "Federico II" di Napoli

Introduzione. L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) può indurre disordini immunologici con differenti espressioni cliniche così come l'artrite, la sindrome Sjogren e varie forme di vasculite.

Scopo di questo lavoro è stato studiare la prevalenza dell'anticorpo anti-peptide anti-ciclico citrullinato (Anti-CCP) in un gruppo di pazienti affetti da artrite HCV-correlata e eventuali correlazioni con fattori reumatoidi (RF) e/o anticorpi anti-nucleo (ANA).

Materiali e Metodi. Sono stati selezionati 30 pazienti con artrite in una popolazione di 380 soggetti affetti da infezioni di HCV. Ogni paziente è stato valutato con esami clinici e radiologici (23 denotavano osteoartrite poliarticolare e 7 monoarticolare); 8 pazienti presentavano anche erosione ossea delle articolazioni coinvolte. Inoltre sono stati valutati RF, ANA, e Anti-CCP nel siero di ciascun paziente.

Risultati. Il 33,3% dei pazienti ha presentato positività per gli anti-CCP senza correlazione diretta con la presenza di una positività per RF e/o ANA. In particolare gli anticorpi Anti-CCP sono risultati presenti nel 50% dei pazienti con erosione articolare grave, e solo in 26,5% pazienti senza erosione articolare.

Conclusioni. I pazienti studiati presentano una significativa prevalenza degli Anti-CCP. Questi dati suggeriscono una considerevole specificità per tale parametro nella diagnosi di artrite reumatoide in pazienti con pregressa infezione HCV, supportando l'ipotesi che l'insorgenza di artrite non è correlata alla replicazione virale ma a diversi meccanismi immunologici.

Bibliografia

Girelli F, Foschi FG, Tedeschi E, Calderoni V, Stefanini GF, Martinelli MG. Is anti cyclic citrullinated peptide a useful laboratory test for the diagnosis of rheumatoid arthritis? *Allerg Immunol* 2004;36:127-30

117

GASTROPANEL: DIFFERENT PATTERNS IN H. PYLORI INFECTED AND CELIAC DISEASE CHILDREN

M. Fasolo¹, G. Guariso², D. Basso¹, C. Bortoluzzi², S. Schiavon¹, F. Favaro¹, A. Tasinato¹, M. Ruggé³, M. Plebani¹

¹Department of Laboratory Medicine, University of Padova, Italy

²Department of Pediatrics, University of Padova, Italy

³Department of Oncological and Surgical Sciences, University of Padova, Italy

Aim. GastroPanel combines the evaluation of pepsinogens A and C (PGA, PGC), anti-H. pylori antibodies (Ab) and gastrin-17 (G17) to identify gastric mucosal inflammation and atrophy. We analysed GastroPanel in H. pylori infected (Hp+) and celiac disease (CD) children.

Methods. 545 children subjected to EGDS. In fasting sera: PGA, PGC, G17, Ab (ELISAs) and total gastrin (tG)(RIA). In gastric juice: pH. Histology for inflammation, Hp and CD diagnosis.

Results. 89 Hp+, 45 CD and 411 Hp and CD negative (control children). PGC and Ab were higher in Hp+ than in controls (F=12.2, p<0.001 and F=35.6, p<0.001). PGA/PGC was reduced in Hp+ (6.8±0.44, mean±SEM) and in CD (6.7±0.67) with respect to controls (10.1±0.52)(F=6.25, p<0.005). tG and G17 were higher in Hp+ (67.6±3.2 ng/L and 7.0±1.7 pmol/L) and CD (103.4±23.6 and 8.6±2.3) than in controls (61.2±2.4 and 3.2±0.4) (F=9.23, p<0.001 and F=9.48, p<0.001). PGC, Ab and G17 correlated with Hp density grade (F=6.44, p<0.005, F=20.79, p<0.001 and F=7.43, p<0.005). PGC correlated also with the degree of antral inflammation (F=6.18, p<0.005) and activity (F=9.89, p<0.001). In Hp+ a direct correlation between PGA and tG was found (r=0.396, p<0.001); in CD this association was opposite (r=-0.388, p<0.05). In Hp+ intragastric pH correlated directly with tG (r=0.264, p<0.05); in CD intragastric pH inversely correlated with PGA (r=-0.336, p=0.06) and directly with tG (r=0.787, p<0.001) and with G17 (r=0.609, p<0.01). In CD histology failed to demonstrate frank gastric mucosal atrophy.

Summary. Hp associated gastritis enhanced serum PGC, Ab and G17. In CD the reduced levels of PGA/PGC suggest that atrophy might involve gastric body mucosa, probably with a patchy pattern escaping routine histology; the consequent reduced gastric acid secretion enhanced gastrin release.

Conclusion. Hp associated gastritis enhances serum PGC and G17. In CD, gastric mucosal atrophy, suggested by the combined PGA/PGC reduced and G17 increased levels, might be extended outside the duodenum affecting the stomach.

118

UTILIZZO DI UN SISTEMA ACQUISIZIONE IMMAGINE IN AUTOIMMUNITA': VANTAGGI E SVANTAGGI

M. Barberis¹, M. Zabeo¹, P. Forneris², F. Rispoli¹, E. Longhi¹

¹Multilab, Multimedica holding S.p.A.

²Lab. Analisi ospedale Aosta, USL Aosta

La diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni per mezzo dei test in immunofluorescenza indiretta (IFI) ha ricevuto un forte impulso negli ultimi anni. Le metodiche IFI sono fortemente influenzate dall'interpretazione soggettiva dei quadri fluoroscopici.

Scopo. Utilizzo di un sistema acquisizione immagine Greenlight 4.0 per il monitoraggio del dato fluoroscopico. Riduzione della soggettività dell'interpretazione dei test IFI per mezzo di un sistema di interfacciamento (interface) tale da consentire a due utenti fra loro lontani, grazie ad un collegamento web, di condividere lo stesso quadro fluoroscopico. **Campione.** Campioni provenienti dalla routine di autoimmunità dal 2004 al 2007 comprendenti test ANA, AMA, ASMA, LKM, APCA, ANCA, anti dsDNA, EMA. Identificazione dei pazienti per mezzo dei dati anagrafici, del numero progressivo di richiesta e dei test IFI richiesti. 40 pattern fluoroscopici complessi analizzati con il sistema interface.

Risultati. Vantaggi: il sistema ha permesso di ottenere una completa tracciabilità del dato fluoroscopico, di costruire un archivio fotografico con la possibilità di recuperare i precedenti di uno specifico paziente, di correlare test IFI differenti eseguiti in tempi diversi, di controllare la variabilità del pattern fluoroscopico e del titolo nel tempo. Molto utile nel facilitare l'apprendimento della lettura in fluorescenza. Il sistema interface ha permesso di ottenere una seconda opinione su 40 casi dubbi consentendo una riduzione dei tempi di refertazione e dei costi evitando l'invio dei campioni in service.

Svantaggi. Costi legati soprattutto al tempo uomo necessario ad utilizzare lo strumento in tutte le sue possibilità. **Conclusione.** Il sistema, a nostro avviso, si è rivelato utile nel facilitare l'interpretazione di quadri fluoroscopici complessi riducendo la soggettività di interpretazione. Un possibile utilizzo potrebbe essere la registrazione solo di casi particolari meritevoli di attenzione e l'uso del sistema di interfacciamento o della semplice e-mail per confrontare la propria opinione con quella di un collega che si ritiene più esperto. Una seconda opinione potrebbe evitare l'esecuzione di esami di approfondimento inutili, mantenere i tempi di refertazione migliorando la qualità del sistema.

119

STUDY OF ACTIVATION, PROLIFERATION, AND EXHAUSTION MARKERS IN HIV INFECTED PATIENTS BY HIGH DEFINITION FLOW CYTOMETRY

M. A. Maiocchi¹, G. Bedini¹, M. Bianchi²

¹*RIGHT Institute, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy*

²*Laboratory of Biotechnology, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy*

Background. HIV chronic stimulation of the immune system induces an activation of lymphocytes which leads to cellular proliferation and favors virus replication. Paradoxically, while viral replication is often high throughout the course of infection, the decline of immunity like the loss of CD4+ T cells is slow.

The aim of the study was to evaluate Cyclin A2 as proliferation marker and PD-1(CD279), as exhaustion marker, together with classical activation markers, to provide predictors of disease progression to complement viral load and CD4+ cell count.

Methods. The study was conducted on 23 naive to antiretroviral treatments HIV infected patients and 15 healthy donors. We used Anti-Cyclin A2-FITC for studying proliferation, PD-1 PE to detect exhausted T cells and CD57 FITC to test residual proliferation capacity; CD38FITC, CD69 PE, CD8 ECD, CD3 PC5 were used to study activated T lymphocytes (PD-1 PE from BD, other antibodies from Beckam Coulter). Samples acquisition was performed through an EpicsXL Coulter cytometer. In patients we evaluated CD4 cell count and plasma viral load.

Results. Cyclin A2 and PD-1 were significantly higher in patients than in donors in both CD3+/CD8+ and CD3+/CD8- T cells: respectively median 1.9% vs 0.45% and 0.2% vs 0.001%, $p < 0.05$, for Cyclin A2 or 3.4% vs 0.3% and 2.5% vs 0.3%, $p < 0.05$, for PD-1.

The expression of CD38 and CD69 on total T lymphocytes was higher in HIV+ patients compared to donors and CD38 was significantly increased in both CD3+/CD8+ and CD3+/CD8- cells. No difference was found for CD57 expression. In patients only CD38, expressed on CD3+/CD8+ cells, correlated with the absolute number of CD4 ($r=0.54$, $p < 0.05$) and viral load ($r=0.54$, $p < 0.05$). An insignificant correlation with viral load was found for Cyclin A2 expression ($r=0.45$, $p=0.051$).

Conclusions. Our data are preliminary but the trend is that not only activation but also proliferation or the exhausted status of the cells is essential for viral replication.

These markers could be used as independent prognostic factors of AIDS progression and could be helpful to clarify those discordant cases of treated patients where the virological response is not followed by a CD4 cell recovery after therapy.

Reference

1. Day C. L et al. Nature 2006;443:350-354.

120

CYTOKINES AND VASCULAR FACTORS PLASMA LEVELS PROFILE OF IN ALZHEIMER'S DISEASE AND DISEASE PROGRESSION

M. M. Corsi¹, G. Dogliotti¹, F. Pedroni¹, E. Galliera¹, E. Porcellini², M. Chiappelli², M. Franceschi³, F. Licastro²

¹*Institute of General Pathology, Medical Faculty, University of Milan, Italy*

²*Department of Experimental Pathology, Medical Faculty, University of Bologna, Italy*

³*Department of Neurology, Castellanza Hospital, Milan, Italy*

The CNS has been labelled as an immunologically privileged site but is now understood to locally produce immune molecules and seems to be accessible to a small number of lymphocytes and monocytes. Findings from animal models of AD suggested that an accelerated process of monocyte recruitment into the brain occurs in this disease. In a mouse models of disease a specific chemokine receptor facilitates the recruitment of microglia within the brain and monocytes from the blood around beta-amyloid deposits. We studied the plasma levels of 13 cytokines or adhesion molecules in AD patients and controls. Seventy two patients (28 male and 44 female; mean age = 75.6 ± 7.2) with a clinical diagnosis of AD and six control subjects (2 male and 4 female; mean age = 73.4 ± 1.1) enrolled from the Department of Neuroscience of Castellanza Hospital, Milan, we investigated. Biochip array technology (Evidence Investigator, Crumlin, UK) was used for simultaneously quantitative detection of multiple analytes from a single patient sample.

Plasma levels of some investigated molecules were statistically different between AD patients and controls. Among cytokines, IL-8 and INF-gamma plasma levels were particularly higher in AD patients than controls. IL-2, IL-6, IL-1alpha and IL-1beta plasma levels were within normal range in AD. Among molecules involved in vascular functions, MCP-1 and VEGF plasma levels were elevated in AD patients. Plasma levels of P-Sel and L-Sel were also statistically different between AD and controls; plasma levels of these molecules being lower in AD. EGF, VCAM-1, ICAM-1, E-Sel plasma levels were within normal ranges. AD were followed up for 2 years and divided in two groups according the cognitive deterioration. Patients with higher levels of IL-8 and IFN-gamma at the begin to the study showed an accelerate cognitive decline. Plasma levels of IL-6 were also higher in patients AD with a fast cognitive decline than in those with low deterioration. AD patients with highest levels of MCP-1, VEGF, EGF and L-Sel showed the fastest cognitive decline

Some cytokines and vascular factors appears to be elevated in peripheral blood of AD and some plasma levels of these molecules are also associated with a different rate of cognitive deterioration.

121

SERUM LEVELS OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGFb) AND INSULINE-LIKE GROWTH FACTOR (IGF-1) IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS PATIENTS

M. R. Metelli¹, P. Bongioanni², F. Fulceri¹, F. Manzone¹, B. Rossi², P. Pietrini¹

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Dep. of Experimental Pathology, University of Pisa

²Neurorehabilitation Unit, Dep. of Neuroscience, University of Pisa

Aim of the study. Fibroblast Growth Factor (FGF basic) and Insulin-like Growth Factor (IGF-1) are trophic factors for motor neurones. The aim of the present study was to investigate whether these factors, released by oxidative stress from motor neurons, might have a role in activating astrocytes, which could in turn initiate motor neuron apoptosis of ALS patients.

Materials and methods. We assayed repeatedly over a two-year period FGF basic and IGF-1 in sera from 49 ALS patients (19 women and 30 men; mean age (\pm SD): 63 (\pm 11) years). 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. Growth Factors were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. Presented growth factors data concern assays at time of diagnosis (T_0) and those at time of the most recent clinical examination (T_n). Mean sFGF levels were, but non significantly, lower in class I and class II patients at T_n vs T_0 ($0,9 \pm 0,9$ vs $2,5 \pm 1,9$ pg/ml, and $3,5 \pm 4,2$ vs $5,7 \pm 8,5$ pg/ml, respectively) and significantly in class I vs class II at T_n vs T_0 ($1,6 \pm 0,9$ vs $4,1 \pm 3,0$ pg/ml, $p=0,03$, Un-paired t test). Mean sFGF levels were higher, but non significantly, in class II vs class III patients at T_n vs T_0 ($3,9 \pm 4,2$ vs $3,0 \pm 1,7$ pg/ml). Mean sIGF-1 levels were significantly higher, in class I and class II patients at T_n vs T_0 ($135,7 \pm 67,4$ vs $44,0 \pm 20,2$ ng/ml, $p=0,05$ and $289,8 \pm 433,9$ vs $89,1 \pm 121,3$ ng/ml, $p=0,04$ respectively, Un-paired t test). Mean sIGF-1 levels were higher, but non significantly, in class I vs class II and class II vs class III patients at T_n vs T_0 ($351,3 \pm 284,3$ vs $311,9 \pm 503,7$, and $186,2 \pm 89,6$ vs $151,6 \pm 262,1$ ng/ml, respectively).

Discussion. Although changes overtime of serum bFGF is not univocal, neither related to disease progression nor to disease severity, IGF-1 values in sera from ALS patients seem to be directly linked to a biological response against neurotoxic noxae, as if a milder disease state maintained for a longer period of time is related to enhanced IGF-1 production.

122

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS PATIENTS

M. R. Metelli¹, P. Bongioanni², F. Manzone¹, F. Fulceri¹, B. Rossi², P. Pietrini¹

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Experimental Pathology, University of Pisa, Italy

²Neurorehabilitation Unit, Department of Neuroscience, University of Pisa, Italy

Introduction. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A), a specific mitogen and survival factor for endothelial cells, is a key promoter of angiogenesis in physiological and pathological conditions.

Recently, VEGF has been reported to be involved in central nervous system physiology and may play a role in the pathogenesis of neurological diseases; in particular, it may be involved in motor neuron degeneration. To verify such a hypothesis in motor neuron disease, in the present study we evaluated VEGF levels in plasma from patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Materials and methods. We assayed repeatedly, over a two-year period, VEGF-A levels in plasma from 49 ALS patients (mean age \pm SD: 63 \pm 11 years). Disease severity was scored by means of the ALS Functional Rating Scale, and patients subgrouped accordingly into 3 classes: Class I (scores between 40 and 31); Class II (scores from 30 to 11); Class III (scores between 10 and 0). Blood samples were drawn in the morning, and plasma was stored immediately at -20° C. VEGF-A was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (BenderMedSystemsGmbH, Vienna).

Results. VEGF-A data refer to assays at time of diagnosis (T_0) and those at time of the most recent clinical examination (T_n). Median VEGF-A levels were higher at T_n than at T_0 , significantly in patients still remaining in Class II at T_n (3,25 vs 0,31 pg/ml, $p=0,01$ Wilcoxon test), and in those shifting from Class I to Class II (10,0 vs 1,24 pg/ml, $p=0,05$ Wilcoxon test), or from Class II to class III overtime (15,0 vs 0,05 pg/ml, $p=0,03$ Wilcoxon test).

Conclusions. Taking into account the neuroprotective role of VEGF-A, our findings seem to point out that patients overall tend to protect themselves by producing increasing VEGF amounts along disease course. Those who are more successful in doing so (as mirrored by enhanced plasma VEGF values) might resist ALS more effectively, thus remaining in Class I or II overtime, instead of worsening.

References

1. Brockington A., Lewis C., Wharton S., Shaw P.J. "Vascular endothelial factor and the nervous system" *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2004 Oct;30(5):427-46

123

CONFRONTO TRA METODI PER LA DETERMINAZIONE DI ANTI-PEPTIDE CITRULLINATO CICLICO (CCP)

R. De Carolis¹, A. Pizzoferrato¹, N. Ursicino¹, E. Zepponi¹

¹Dip. di scienze diagnostiche, U.O. Patologia Clinica, Osp. S. Camillo de Lellis, Rieti

Obiettivi. La ricerca degli anticorpi anti-CCP viene proposta per la loro migliore specificità diagnostica per artrite reumatoide (AR) e per la possibilità di rilevare una positività nelle prime fasi di malattia, caratteristiche particolarmente utili nelle artriti indifferenziate. Abbiamo confrontato alcuni test commerciali per anti-CCP su una casistica di routine.

Materiali e Metodi. Abbiamo valutato 228 campioni in tre mesi. Tutti i sieri sono stati analizzati con il test automatizzato MEIA (Abbott AxSYM anti-CCP), in confronto con i test EIA Menarini, sia di seconda (Men2: 66 campioni) che di terza generazione (Men3: 162 campioni). Su 52 campioni selezionati è stato eseguito anche un terzo test EIA (Delta). Tutti questi test hanno un formato indiretto ed una fase solida rivestita di peptidi ciclici sintetici ed esprimono i risultati in unità(U)/mL, con differenti soglie di positività (20 U/mL per i test Menarini, 15 U/mL per Delta, 5 U/mL per AxSYM). Per effettuare il confronto abbiamo convertito i risultati positivi ottenuti con i vari metodi in rapporto campione/valore soglia (S/CO).

Risultati. La casistica comprendeva 169 femmine e 59 maschi (età media 57,8+15,4 anni, mediana 60, il 71,1% >50 anni). La frequenza di positività era del 25% con Men2, del 20% con Men3 e del 12,5% con AxSYM, con percentuali più elevate >50 anni. La concordanza qualitativa tra AxSYM e Men2 era dell'86,4% e tra AxSYM e Men3 del 90,7%. I discordanti erano tutti campioni positivi o "borderline" (S/CO tra 0,9 e 2,5) con EIA e negativi con AxSYM. Tra AxSYM e Men3 era presente una discreta correlazione ($r=0,892$) sui positivi concordanti. Sui campioni selezionati il test Delta è risultato negativo su 19 dei 20 campioni positivi Men3 e negativi AxSYM.

Discussione. Come di recente osservato vi sono delle differenze di prestazione tra i dosaggi per anti-CCP, anche in ragione della mancanza di standardizzazione, che rende problematico un confronto quantitativo tra metodi(1). La nostra esperienza indica che il dosaggio automatizzato su AxSYM, oltre ad essere più rapido e di maggiore semplicità operativa, è più specifico rispetto ai test EIA, e può quindi rivelarsi di maggior valore diagnostico per AR.

Bibliografia

1. D. Coenen et al, Clin Chem 2007;53(3):498-504.

124

MODULATION OF VAGINAL IMMUNE RESPONSE AMONG PREGNANT WOMEN WITH BACTERIAL VAGINOSIS BY CONCURRENT INFECTIONS

S. Cauci¹, M. Di Santolo¹, F. J. Culhane²

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

²Department of Obstetrics and Gynecology, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, USA

Objective. To examine the influence of co-infections on vaginal innate and adaptive immunity, and microbial enzyme activities of pregnant women with bacterial vaginosis (BV).

Methods. The population consisted of 265 singleton pregnant women in early gestation (<20 weeks of gestation) with BV (Nugent 7-10) who had vaginal fluid collected for measurement of IL-1 β and IL-8 concentrations, number of neutrophils, anti-Gardnerella vaginalis hemolysin (Gvh) IgA, and activities of microbial sialidase and prolidase.

Results. Among women with BV, median levels of vaginal IL-1 β (4-fold, $P=0.005$), IL-8 (4-fold, $P<0.001$), and neutrophils (6-fold, $P=0.013$) were greatly increased in women with *T. vaginalis* with respect to women without any co-infection. Yeast increased the level of IL-8 (5-fold, $P<0.001$), but not IL-1 β ($P=0.239$) and neutrophils ($P=0.060$). *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* had no effect on vaginal cytokines. None of the co-infections influenced vaginal anti-Gvh IgA, sialidase and prolidase activities.

Conclusions. The strong proinflammatory cytokine induction by *T. vaginalis* may contribute to the observed increase in preterm birth among BV positive women co-infected with *T. vaginalis* treated with metronidazole.

125

VALUTAZIONE DI UN NUOVO TEST PER LA DIAGNOSTICA DEL MORBO CELIACO: ANTICORPI DIRETTI CONTRO PEPTIDI SINTETICI DEAMIDATI DELLA GLIADINA

T. Imbastro¹, C. Palmerini¹, A. M. Marini¹, F. Moccia¹, A. Tracanna¹, F. Pistola¹

¹Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale Regionale Spirito Santo, Pescara

Introduzione. Condizione cronica autoimmune risultante in una sindrome da malassorbimento. L' agente responsabile è la gliadina. I test di routine disponibili in commercio per la ricerca degli AGA spesso dimostrano scarsa sensibilità e specificità rispetto a test quali anticorpi anti endomisio (EMA) e anti transglutaminasi (tTG).

Recenti studi hanno dimostrato che gli anticorpi anti gliadina di pazienti con malattia celiaca si legano meglio alla gliadina che e' stata deamidata tramite azione enzimatica della transglutaminasi.

Abbiamo valutato un nuovo kit ELISA per la ricerca di anticorpi anti peptidi deamidati della gliadina (DGP)(INOVA Diagnostic Inc.San Diego, CA)

Materiali. 88 campioni di siero selezionati sono stati testati per la diagnosi sierologica della malattia celiaca con un pannello anticorpale che includeva AGA convenzionali, EMA e tTG. Sugli stessi campioni di siero abbiamo testato gli anticorpi anti DGP.

Risultati. All'arruolamento nello studio i sieri selezionati avevano mostrato uno dei tre profili del pannello anticorpale relativo alla malattia celiaca: 18 erano risultati positivi per EMA e tTG (profilo A), 62 erano risultati negativi per EMA e tTG, ma positivi per AGA convenzionali G e/o A (profilo B) e 8 erano negativi per tutte e quattro le determinazioni (profilo C).

13 su 18 del profilo A furono riscontrati positivi anche per AGA convenzionali (72,2%) e 15 su 18 (83,3%) positivi per DGP.

55 dei 62 campioni di pazienti non celiaci che erano stati riscontrati negativi per EMA e tTG, ma positivi per AGA, furono trovati negativi per DGP (88,7%).

Gli 8 campioni negativi per EMA, tTG e AGA furono riscontrati negativi anche per DGP A e G.

Conclusioni. In via preliminare dunque sembrerebbe che la determinazione degli anticorpi anti DGP per la loro maggior sensibilità e specificità rispetto agli AGA convenzionali possa essere di valido aiuto nella diagnosi sierologica di malattia celiaca, in particolare in quelle situazioni in cui EMA e tTG sono dubbi.

Bibliografia

Aleanzi M., Demonte A.M., Esper C., Garcilazo S., e M. Waggener. 2001 Celiac disease antibody recognition against native and selectively deaminated gliadin peptides. Clin.Chem. 47:2023-2028.

126

INFLAMMATORY CYTOKINES AND RECEPTORS IN PLACENTAS FROM PREGNANCIES COMPLICATED BY HELLP SYNDROME

V. Pozzi¹, A. L. Tranquilli², B. Landi², A. Corradetti², S. R. Giannubilo², D. Sartini¹, M. Emanuelli¹

¹Ist. di Biotecnologie biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

²Ist. di Scienze Materne e Infantili, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Hypertensive disorders during pregnancy are associated with high increase of perinatal and maternal morbidity and mortality, and the HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count) syndrome is the most devastating of these disorders, and is a possible cause of maternal or infant death in industrialized countries. HELLP syndrome is a multisystemic disease of unknown etiology and most of its pathophysiologic aspects reflect abnormalities in the immunological system function. The objective of the present work was to investigate the expression pattern and the role of inflammatory cytokines and their receptors in the placentas from pregnancies complicated by HELLP syndrome.

Placentas were collected after cesarean section, ten from normal pregnancy and ten from HELLP. Macroarray analyses were performed with GEArray Q Series Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Array HS-015 (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD). The data were confirmed by quantitative Real-Time PCR. The Student's t test was used for statistical analysis. The expression of 14 genes was significantly different between the two groups, in particularly 9

genes were up-regulated and 5 were down-regulated in the HELLP group. Differential gene expression measurements (HELLP versus normal), performed by real-time PCR technique, revealed a significant up-regulation for IL-10 (1.3-fold), IL-6 receptor (1.6-fold), and TGF- β 3 (2.5-fold), while the expressions of CCL18 (0.3-fold), CXCL5 (0.2-fold), and IL-16 (0.5-fold) were significantly decreased (P < 0.05). In HELLP group no significant differences were found in correlation analysis between cytokines expression and others variables including gestational age at delivery.

Our data seem to suggest that the regulation of cytokines involved in angiogenesis and adaptive immune responses may be critical for the placental vascular dysfunction, and support the hypothesis that HELLP syndrome could be a placental inflammatory response which leads to a systemic and endothelial dysfunction.

127

DETERMINATION OF ADIPONECTIN MULTIMERS IN HUMAN CIRCULATIOND. Giannessi¹, M. Maltinti¹, C. Colotti¹, M. Cabiati¹, S. Del Ry¹¹CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa

Purpose. Adiponectin, a biologically active substance released by adipocytes, is considered as a new diagnostic/prognostic marker in the cardiovascular disease. This protein presents a multimeric structure; the trimeric low- (LMW), the hexameric middle- (MMW) and the high-molecular weight (HMW) isoforms have been found in human peripheral circulation. The determination of the different isoforms, specially of HMW that is an active form, could give additional information on the role of this protein.

Aim. To evaluate the analytical features of a commercial system devoted to measure the adiponectin multimers in human plasma.

Methods. An Elisa system (Alpco Diagnostics, US) was used to directly measure the total (T) and, after treatment with two different specific proteases, the HMW and the (MMW + HMW) forms while the concentrations of the MMW and LMW were obtained by difference. For comparison purpose, T adiponectin was also measured by a widely used Elisa (Linco Res US). EDTA plasma samples from 64 non-obese subjects were analysed and, in a subset of samples, also serum was checked.

Results. HMW is the predominant isoform in plasma and accounts for 50% of T adiponectin; MMW and LMW represent each the 25% of total protein. Between-assay was 10.8 % for T and about 15% for HMW and (HMW + MMW) determination (n=10); within-assay variability was lesser than 5%. No important differences were observed between the values obtained in plasma and in serum samples (p=ns, paired t-test). As to the absolute values, T adiponectin levels measured by Alpco system were lower than those measured by Linco, ($5.7 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$ vs 11.6 ± 0.92 , mean \pm sem), although closely related ($r=0.81$, $p<0.001$). This difference is probably due to the different isoform measured, dimeric and monomeric, respectively.

Conclusions. These data confirm that in human plasma are present measurable amounts of adiponectin multimers and that HMW is the predominant isoform. The evaluation of the adiponectin multimers in different clinical settings could help to better understand the biological action of this pleiotropic hormone.

Reference

Ebinuma H. et al. A novel Elisa system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clin Chim Acta* 2006;372:47-53.

128

DETERMINAZIONE DELL'IPOVITAMINOSI B12 TRAMITE DOSAGGIO DELLA VITAMINA B12 ATTIVA E DEI PARAMETRI METABOLICAMENTE CORRELATIC. Novi¹, O. Marsi¹, B. Grandi¹, D. Pieri¹, P. Crocetti¹, C. Bichisechi¹, D. Michela¹, G. Pellegrini¹, F. Bamonti², G. A. Moscato¹¹U.O. Lab. Analisi Chimico-Cliniche, Ospedale di Cisanello, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa²Dip. Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Osp. Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena-Fondazione IRCCS, Milano

Obiettivi. La forma biologicamente attiva di vitamina B12 è il complesso B12-Transcobalamina II (HoloTC). Per verificare la presenza di uno stato vitaminico carenziale è stata valutata la correlazione tra vitamina B12 attiva ed altri parametri metabolicamente relati.

Metodi. Sono stati raccolti sieri di routine, con valori di vitamina B12 totale da considerare a rischio per uno stato carenziale ($<221 \text{ pmol/L}$). Su ciascun siero sono stati determinati: folato e vitamina B12 totale in chemiluminescenza (CMIA) su Abbott Architect i2000, creatinina con test cinetico su Roche Modular, Omocisteina (Hcy) e Vitamina B12 attiva con immunoenzimatica a cattura di microparticelle (MEIA) su Abbott AxSYM.

Risultati. Tra i 250 soggetti arruolati (età media $56,2 \pm 21,5$ anni, mediana 59, range 14-98) vi erano 143 donne (età media $54,2 \pm 23,1$ anni, mediana 53, range 14-98) e 107 uomini (età media $59,0 \pm 18,8$ anni, mediana 63,5, range 16-93). I livelli di B12 totale erano in zona grigia (GZ; $139-221 \text{ pmol/L}$) in 126 soggetti e bassi (L; $<139 \text{ pmol/L}$) in 124 casi. I livelli medi di B12 attiva erano rispettivamente $46,5 \pm 16,2 \text{ pmol/L}$ nei soggetti GZ e $34,2 \pm 14,0$ nei soggetti L ($p < 0,005$). Adottando una soglia carenziale per B12 attiva di 40 pmol/L la frequenza di valori bassi era del 68,2% tra i campioni L e 37,9% tra i campioni GZ ($p < 0,01$). La vitamina B12 attiva mostrava una debole correlazione con la vitamina B12 totale sia su tutti i campioni ($r = 0,420$) sia sui campioni L ($r = 0,337$) e nessuna correlazione con gli altri parametri considerati.

Conclusioni. I nostri dati indicano che la concentrazione di vitamina B12 attiva è in parte indipendente da quella della B12 totale. I dati sembrano confermare l'utilità del dosaggio della B12 attiva a scopo preventivo su soggetti asintomatici con carenza di B12 totale non ancora evidente. E' verosimile che l'associazione delle due determinazioni, piuttosto che la misurazione della sola vitamina B12 totale o della sola frazione attiva, possa fornire un migliore inquadramento dello stato carenziale (1).

Bibliografia

1. Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, Kushnir, MM, Allen LH, Haan MN, Green. R. Measurement of Total Vitamin B12 and Holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2006;52(2):278-285.

129

STUDIO PRELIMINARE SUL DOSAGGIO DI ALFA-FETO PROTEINA SU LIQUIDO AMNIOTICO SU ANALIZZATORE AIA 1800 TOSOHL. Germagnoli¹, M. Pontillo¹, D. Alessio¹, C. Ferrero¹, M. Murone¹, P. Bonini¹¹Laboratorio grande produzione Laboraf, Osp. San Raffaele, Milano

I difetti del tubo neurale sono un gruppo di patologie dell'embrione e comprendono malformazioni del sistema nervoso centrale dovute ad una alterazione della differenziazione e fusione delle strutture encefalo-midollari e/o delle relative strutture di rivestimento e sono la conseguenza di meccanismi che intervengono precocemente durante la chiusura e morfogenesi del tubo neurale.

Nello screening biochimico dei difetti del tubo neurale (DTN), presso l'Ospedale San Raffaele di Milano il dosaggio delle concentrazioni di alfa-feto proteina (AFP) nel liquido amniotico (LA) viene richiesto in tutte le gravidanze tra la 14° e la 18° settimana in caso di esecuzione dell'amniocentesi. Brock e Sutcliffe (1972) osservarono un aumento delle concentrazioni dell'AFP nel LA, durante la prima parte del secondo trimestre, in presenza di un feto affetto da DTN. Tuttavia i valori di LA-AFP osservati in gravidanze normali e gravidanze patologiche si sovrappongono parzialmente e ciò rende difficile dare significato clinico alle concentrazioni osservate di LA-AFP.

Presso Laboraf il dosaggio di LA-AFP viene eseguito su analizzatore AIA 1800 (Tosoh Bioscience, Tokyo Japan) interfacciato con un sistema di automazione totale di laboratorio e con modalità totalmente automatizzata. L'analizzatore utilizza un metodo immunofluorimetrico ed impiega come marcatore l'enzima fosfatasi alcalina.

Nella seguente tabella è riportata la distribuzione delle concentrazioni di LA-AFP nei pazienti esaminati presso la nostra istituzione nel mese di Novembre – Dicembre 2006.

WEEKS	15	15+2	15+3	15+5	15+6	16	16+2	16+3	16+5	16+6	17	18+
MEDIA NG/ML	20393	17398	16901	17805	16828	17544	16205	15887	14789	14099	14558	11287
MEDIANA NG/ML	20226	18029	15649	17040	16520	16999	15513	15838	14535	13262	13955	10460
INF(-3sd) NG/ML	10408	8972	6700	4915	3042	3550	5861	4296	3603	5640	1876	1132
SUP(+3sd) NG/ML	30378	26723	27103	30694	30614	31538	26549	27478	29975	22558	27241	21441
MOM-MIN NG/ML	0,752	0,691	0,764	0,598	0,592	0,464	0,733	0,527	0,609	0,794	0,579	0,443
MOM-SUP NG/ML	1,292	1,292	1,557	1,798	1,688	1,659	1,744	1,638	1,728	1,804	1,94	2,122

130

DEFINIZIONE DEI CUTOFF PER LE TRANSGLUTAMINASI IGA PER L'ORIENTAMENTO DIAGNOSTICO NELLO SCREENING DELLA MALATTIA CELIACAM. C. Mellone¹, D. Palmieri¹, L. D'Angelo¹, G. Salerno¹¹Dipartimento Assistenziale di Medicina di Laboratorio, AOU Federico II, Università degli Studi di Napoli

Gli anticorpi antitransglutaminasi IgA (tTGA) sono considerati insieme agli anticorpi antiendomio (EMA), i principali autoanticorpi che si sviluppano nei pazienti affetti da Malattia Celiaca.

Scopo dello studio. Definire valori di cutoff per lo screening di pazienti con sintomatologia o familiarità ascrivibile alla malattia celiaca e per il monitoraggio dei pazienti celiaci a dieta.

Metodo. Su 3260 pazienti ricoverati e/o afferenti all'Ambulatorio di Medicina di Laboratorio dell'AOU Federico II da ottobre 2006 ad aprile 2007 sono stati effettuati i dosaggi di tTGA con metodo ELISA indiretta con kit Delta (cutoff negativo <10U/mL) su analizzatore automatico Mago P. Su 2961 pazienti i valori di tTGA sono risultati <1U/mL. Sui restanti 299 campioni con tTGA >1.1 sono stati dosati gli EMA determinati in immunofluorescenza indiretta. Tali campioni sono stati suddivisi in 3 gruppi associando i valori di tTGA, da 1.1 a 10 con i risultati degli EMA negativo e positivo; a tutti i 299 pazienti era stata eseguita la biopsia intestinale per determinare la diagnosi. Per valutare l'efficacia diagnostica delle tTGA, i valori del test sono stati comparati con le diagnosi definitive, utilizzando la Curva ROC.

Risultati. N°campioni=299; gruppo1= n° campioni 151, tTGA tra 1.1 e 2; gruppo2 n° campioni 89, tTGA 2.1-5; gruppo3 n° campioni 59, tTGA 5.1-10.

Gruppo1= EMA- n°c 127 (84.1%); EMA+ n°c 24 (15.8%). Area sottesa curva ROC=0.716 (CI 0.637-0.786), p=0.0006;

Gruppo2= EMA- n°c 36 (40.4%); EMA+ n°c 53 (59.5%). Area sottesa curva ROC=0.648 (CI 0.539-0.746) p=0.0111;

Gruppo3= EMA- n°c 8 (13.5%); EMA+ n°c 51 (86.4%). Area sottesa curva ROC=0.556 (CI 0.421-0.686) p=0.5977

Conclusioni. Dall'analisi dei dati statistici si evince che per lo screening della MC gli intervalli di riferimento per t-TGA debbano essere così modificati: fino a 1= negativo; tra 1.1 e 5 = dubbio; > 5= positivo.

Nello studio non sono stati inseriti i soggetti affetti da deficit di IgA.

Bibliografia

Reeves, Gleen E.M. et al. Diagnostic accuracy of coeliac serological tests: a prospective study, E. J.G.&H., 18(15):493-501, May 2006

131

EVALUATION OF LDL-BOUND LOW MOLECULAR WEIGHT THIOLS DISTRIBUTION

A. Zinellu¹, S. Sotgia¹, B. Scanu¹, S. Manca², S. Magliona², P. Maieli¹, A. Bacciu¹, P. Occhineri¹, L. Deiana¹, C. Carru¹

¹*Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica – Dipartimento di Scienze Biomediche – Università degli Studi di Sassari*

²*Laboratorio di Medicina di Base ASL N°1 di Sassari*

Low molecular weight aminothiols such as homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione and glutamylcysteine are able to react with a number of thiol-combining groups, many of which are present in proteins and other biological significant molecules. It has been recently demonstrated that LDL apoprotein is able to bind the most concentrated plasma thiols such as Cys, CysGly and Hcy by disulphide linkage (1). However the LIF capillary electrophoresis assay employed to measure linked thiols was not sensitive enough to verify whether also low concentrated plasma thiols as GSH and GluCys are linked to apoprotein. By modifying sample treatment and electrophoretic parameters, we set up a new method with a limit of quantification of about 1.5 nmol/L, by which we demonstrated that LDL apoprotein binds all physiological plasma thiols. The increased sensitivity was obtained by drying released apoB thiols after reduction treatment, dissolving them directly in a low volume of derivatization buffer and decreasing dilution factor of derivatized sample before CE injection. Moreover, by increasing the concentration of the electrolyte buffer, we improved the selectivity of peaks, in particular between GSH and impurity peak derived from unreacted 5-IAF that in the previous electrophoretic conditions were overlapped. Separation of thiol-IAF adducts was performed in a 75m ID and 57cm length uncoated fused-silica capillary using 30 mmol/L sodium phosphate, 33 mmol/L boric acid as electrolyte solution with 75 mmol/L N-methyl-D-glucamine (pH 11.3). Precision tests, performed after repeated injection of the same sample, indicate a good repeatability of the method both for migration times (CV <0.6%) and areas (CV <2.7%). A good reproducibility of intraassay and interassay tests was besides obtained (CV <7.5% and CV < 10.5% respectively). The method optimization, reached by searching the best combination between sample matrix and capillary electrophoresis run buffer, is fully described. Given the potential pathologic significance of protein thiolation, the proposed method may be useful to understand the mechanisms and the balances that regulate the interaction between thiols and -SH free groups of proteins.

References

1. Zinellu A. et al Clin. Chem. 2005,51,658

132

LA CHIMICA SECCA: HDL COLESTEROLO SENZA PRETRATTAMENTO VALUTAZIONE DEI LIMITI DI RIFERIMENTO SU UN GRUPPO CAMPIONE DI 17562 CASI DEL BACINO DI UTENZA ABRUZZESE

C. Vanni¹, C. D'Ortona¹, F. Massimini¹, A. Faleo¹, A. Bianco², C. Romano¹

¹*Laboratorio Analisi P.O. SS Annunziata Chieti*

²*C.L. in Tecniche di laboratorio Biomedico Università "G. D'Annunzio" Chieti*

Scopo. Il lavoro analizza i dati, estrapolati dal sistema informatico, relativi a Trigliceridi (TG), Colesterolo totale (CT) e HDL del bacino di utenza di Chieti da maggio a settembre 2006 allo scopo di rivalutare, principalmente, i valori di riferimento del Colesterolo HDL dopo l'attivazione di una nuova metodica di chimica secca senza pretrattamento.

Materiali e metodi. Analizzatore Vitros 950 della ditta J e J che utilizza una lastrina multistrato con acido fosfogustico e cloruro di magnesio per la separazione delle frazioni non hdl (1).

L'analisi dei dati comprende 17562 campioni divisi in due sottogruppi Ospedalizzati e Ambulatoriali ed in quattro fasce di età di ampiezza ventennale.

Analisi statistica non parametrica: test di Kruskal-Wallis, test di Mann-Whitney.

Risultati e conclusioni. Nel sottogruppo ambulatoriali abbiamo analizzato 8562 colesterolo, 7871 trigliceridi e 4599 Colesterolo hdl. Le mediane ottenute nei due sessi sono stati:

Mediana Femmine (mg/dL)

197,00 Colesterolo Totale

93,00 Trigliceridi

55,00 HDL

Mediana Maschi (mg/dL)

189,00 Colesterolo Totale

107,00 Trigliceridi

45,00 HDL

L'analisi dei dati, test di Kruskal-Wallis, ha dimostrato una differenza significativa (P= 0.00) fra i gruppi ospedalizzati ed ambulatoriali, come ci aspettavamo, per i tre analiti in oggetto. Il colesterolo HDL, nelle fasce di età, ha evidenziato un andamento crescente con l'aumentare dell'età nelle femmine ed esattamente il contrario nei maschi. I valori di riferimento nel campione ambulatoriale si sono confermati analoghi al nostro lavoro precedente: M= 31.85-78.73mg/dL e F= 39.1-97.6 mg/dl utilizzando il 95% centrale della distribuzione non parametrica.

Bibliografia

1. NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline. NCCLS document EP5-A (ISBN 1-56238-368-x). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA,1999.

133

BIOCHEMICAL DETERMINANTS OF LIPOPROTEIN(A) IN THE GENERAL POPULATIONG. Lippi¹, G. Targher², M. Franchini³, G. L. Salvagno¹, M. Montagnana¹, G. C. Guidi¹¹Sez. *Chimica Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona, Italy*²Sez. *Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Università di Verona, Italy*³*Servizio Immunoematologia e Trasfusione, Az. Ospedaliera di Verona, Italy*

Lipoprotein(a)(Lp(a)) is an independent risk factor for cardiovascular disease. Although its plasma levels are mostly genetically regulated, metabolic disorders may influence synthesis and catabolism, such as diabetes mellitus, impaired renal function, acute or chronic inflammation, and impaired liver protein synthesis. Therefore, comprehension of the biological variability associated with the most common metabolic disorders that influence Lp(a) metabolism is essential to optimize clinical usefulness of this measurement. With the aim to investigate the relationship between Lp(a) and biochemical markers of metabolic diseases, we performed a retrospective analysis on the database of our Laboratory Information System to retrieve results of fasting plasma glucose (FPG), creatinine, albumin, C reactive protein (CRP) and Lp(a) tests performed on outpatients referred by the general practitioner for routine blood testing between April 2002 and April 2007. Cumulative results for the all the above parameters were retrieved for 1,195 adults (M/F=469/726; age 53±19; range 18-89 years). After stratifying Lp(a) values according to the respective threshold values of albumin, estimated glomerular filtration rate (eGFR), FPG and CRP, a significant difference was only observed in subjects with increased CRP levels (170 mg/L, 95% CI 24-1032 mg/L versus 125 mg/L, 95% CI 24-957 mg/L; $p<0.0001$). Accordingly, the prevalence of Lp(a) values >300 mg/L was significantly higher in patients with concurrently increased CRP levels (36% versus 26%; $p=0.037$), but not in patients with abnormal values of albumin, FPG and eGFR as compared to patients with values of these markers within the respective reference ranges. In multiple linear regression analysis Lp(a) was significantly associated with CRP ($p=0.007$) and age ($p=0.018$). Results of our analysis suggest that the evaluation of laboratory markers of glucose homeostasis, renal and liver function would not be necessary when measuring Lp(a) for cardiovascular risk assessment in the general population. Conversely, CRP might be of value to identify those individuals whose Lp(a) levels are altered according to transient changes promoted by an inflammatory reaction rather than to unfavourable Lp(a) levels per se.

134

DIETARY PHYTOSTEROL SUPPLEMENTATION AND CHOLESTEROL HOMEOSTASIS IN PAEDIATRIC HYPERLIPIDEMIAL. Mannucci¹, P. Bertucci¹, A. F. Mozzi¹, C. Fabbri¹, M. Casella¹, M. Perrone¹, L. Liberatoscioli¹, O. Guardamagna², C. Cortese¹, G. Federici¹¹*Dip. Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma*²*Dip. Pediatria, Università degli Studi di Torino*

Objective. Cholesterol and plant sterols (phytosterols) are structurally similar, but undergo markedly different metabolic fates. Plant sterols and their saturated derivatives, stanols, reduce circulating LDL-cholesterol by competitively inhibiting intestinal cholesterol absorption. For the reduction of cardiovascular disease risk in selected patients, phytosterols can be added to the diet as a supplement, in a daily dose of 1.6-2.0 g, which can lower plasma LDL-cholesterol levels of some 10%. However, it has been shown that patients with the rare genetic condition β -sitosterolemia, who overabsorb phytosterols - mainly β -sitosterol - develop premature atherosclerosis, and also that some phytosterols are associated with an increased prevalence and incidence of coronary events. Aim of this study was (1) to assess the cholesterol-lowering efficacy of dietary phytosterols in paediatric patients; (2) to evaluate the predictive value for the response to treatment of high vs low sterol absorption/synthesis rates; (3) to verify whether and to what extent an increment in circulating phytosterols occurs.

Methods. 36 hyperlipidemic children (18 FH, 18 FCHL) were treated with phytosterol supplement for 2 months. Lipid profile and biochemical markers of cholesterol synthesis (desmosterol, lathosterol) and absorption (campesterol, sitosterol) were evaluated at basal conditions and at the end of treatment. 20 healthy children were also analysed as controls. Lipids were measured by standard routine methods. Sterols were measured by GC-MS and by LC-APCI-MS/MS.

Results. According to the reduction in plasma LDL-cholesterol observed, patients were classified as Responders (R; LDL-cholesterol reduction $\geq 7\%$) or Non Responders (NR). All R showed higher basal absorption rates compared to NR (camp/latho=3.79 vs 2.89, respectively; sito/latho=1.43 vs 1.05, respectively. Values expressed as median concentration ratio). In all patients, plant sterol supplementation produced minimal, non significant changes in circulating phytosterols. **Conclusions:** Dietary phytosterol supplement seems to be a safe strategy for modest reduction of cholesterol levels in children. A sub-category of hyperabsorbers appear to respond more efficiently to such treatment.

References

John et al., *Curr Opin Lipidol* 18:35-40,2007

135

RIDUZIONE DEL N-TERMINAL BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (NT-PROBNP) DURANTE IL RICOVERO E PROGNOSI

A. Terreni¹, V. Valerio², A. Ognibene¹, F. Pirolo¹, M. S. Rutili², C. Lombardo², F. Bacci², C. Nozzoli², G. Messeri¹

¹Lab. Generale, D.A.I Diagnostica di Laboratorie A.O.U. Careggi, Firenze, Italia

²Medicina interna, D.A.I. Medicina Interna e d'emergenza A.O.U. Careggi, Firenze, Italia

Il N-terminal brain natriuretic peptide (NT-proBNP) viene proposto come marker per escludere in fase acuta lo scompenso cardiaco ma anche per il monitoraggio dei pazienti affetti da tale patologia. È stata condotta uno studio prospettico finalizzato a valutare se la riduzione del NT-proBNP in pazienti ricoverati per scompenso cardiaco, espressa in %, possa avere un significato prognostico in sei mesi di follow-up. In 120 pazienti (età media 77.8+9) consecutivamente ricoverati nell'Unità di Medicina Interna dell'AOUC per scompenso cardiaco, è stato misurato il NT-proBNP plasmatico al momento del ricovero (valore medio 10912 + 12239 pg/ml) ed alla dimissione (valore medio 4701 + 4898 pg/ml). La riduzione media % è stata del 57% con una media di ospedalizzazione di 8.6 + 4 giorni. Durante i sei mesi successivi di follow-up, in 52/120 (43.3%) dei pazienti è stato registrato un evento legato alla patologia cardiovascolare. In particolare: 9 (7.5%) sono deceduti per cause cardiovascolari, 43 (35.8%) sono stati ricoverati nuovamente per scompenso. Nei pazienti senza eventi cardiovascolari, nei sei mesi di follow-up la riduzione media % dell' NT-proBNP è stata maggiore rispetto a quella dei pazienti con eventi (39.5%+7.4 vs. 26.3%+5.9; p=0.04). L'area sotto la curva (ROC) per la riduzione % dell' NT-proBNP è stata di 0.63 (95% CI, 0.51-0.75; p=0.04) per l'end-point composito (morte e nuovo ricovero) e 0.81 (95% CI, 0.65-0.97; p=0.01) solo per il decesso. Una riduzione % di NT-proBNP < 30% risulta il cut off più efficiente per l'identificazione di pazienti a rischio di eventi, con una sensibilità del 61% e una specificità del 55%. Per il decesso un cut off <15% di riduzione % di NT-proBNP ha mostrato una sensibilità dell' 83% e una specificità dell' 80%, con un valore predittivo negativo del 98%. L'analisi multivariata ha messo in evidenza come solo la riduzione % di NT-proBNP < 30% sia stata l'unica variabile indipendente associata all'evento registrato nei primi sei mesi. Una riduzione % di NT-proBNP > 30% durante l'ospedalizzazione ha una prognosi migliore nei sei mesi successivi alla dimissione. Suggestivo che la variazione % dei livelli di NT-proBNP durante il ricovero è più utile del valore assoluto alla dimissione.

136

RELAZIONE TRA NT-proBNP, PARAMETRI DOPPLER DI FLUSSO TRANSMITRALICO E SCORE CLINICO IN PAZIENTI AMBULATORIALI CON SCOMPENSO CARDIACO

C. Cocco¹, L. Zanolta², N. Zanella¹, C. Lo Cascio¹, M. Bertolani¹, G. Zanotto², G. Golia², L. Tomasi², P. Rizzotti¹, C. Vassanelli²

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

²Div. Clinicizzata di Cardiologia, Università di Verona

Scopo del Lavoro. È stata analizzata la concordanza tra valutazione clinica, dosaggio di NT-proBNP e doppler transmitralico, nel valutare l'andamento clinico di pazienti con scompenso cardiaco in terapia medica ottimizzata.

Materiali e Metodi. Il dosaggio di NT-proBNP è stato effettuato con reagente PBNP (Dade Behring) su Dimension RxL. La valutazione ha riguardato 32 pazienti in II-III classe NYHA, portatori di defibrillatore impiantabile, esaminati a cadenza mensile (210 rilievi), come parte di uno studio osservazionale multicentrico.

La valutazione clinica è stata espressa in modo semiquantitativo mediante calcolo del punteggio Heart Failure Score, basato su sintomi e segni di scompenso, già utilizzato come endpoint secondario nello studio OPTIME-CHF. La registrazione Eco-Doppler del flusso transmitralico è stata utilizzata per derivare dati indiretti di pressione di riempimento ventricolare: le velocità di picco dell'onda E e dell'onda A, il loro rapporto (E/A) ed il tempo di decelerazione dell'onda E (dtE). La relazione tra le variabili cliniche ed ecocardiografiche è stata studiata con un modello misto di analisi della varianza, per tenere in considerazione la non indipendenza dei dati entro paziente.

Risultati. Non è stata riscontrata relazione tra NT-proBNP ed Heart Failure Score, mentre la relazione è altamente significativa con l'onda E, l'onda A, il loro rapporto ed il dtE (p<0.001). Dividendo infatti i rilievi secondo il valore mediano di ciascuna variabile, i valori mediani di NT-proBNP erano significativamente più alti nei pazienti con onda E sopra la mediana (p<0.001), tendenzialmente più bassi in pazienti con ampiezza dell'onda A sopra la mediana, significativamente più alti nei pazienti con valori di rapporto E/A sopra la mediana (p=0.003) e significativamente più alti nei pazienti con dtE sotto la mediana (p<0.001).

Discussione e Conclusioni. La determinazione dell'NT-proBNP in pazienti ambulatoriali con scompenso cardiaco, se da un lato non presenta correlazione con un punteggio clinico, fornisce tuttavia una valutazione dell'andamento temporale correlata alla valutazione eco Doppler: essa ha quindi la potenzialità di rilevare in modo più economico e pratico variazioni documentabili con l'esame ecocardiografico.

137

DISTRIBUTION OF cTnI VALUES IN A LARGE POPULATION OF ADULT HEALTHY SUBJECTSC. Prontera¹, A. Fortunato², G. Zucchelli¹, S. Storti¹, M. Emdin¹, A. Clerico¹¹CNR, Istituto di Fisiologia Clinica, Pisa²Lab. di Chimica Clinica ed Ematologia, Osp. "S. Bartolo", Vicenza

The international guidelines recommend that an increased concentration of cardiac troponin should be defined as a measurement exceeding the 99th percentile of the distribution in a reference group, measured with an imprecision lower than 10% CV. In order to achieve this goal it is necessary to accurately measure both functional sensitivity (i.e., imprecision at 10% CV) and the distribution of cTnI in a large population of healthy subjects. The aim was to evaluate the analytical performance and clinical results of measurement of cTnI-Ultra on ADVIA CP® platform (Siemens Medical Solutions Diagnostics Srl). We enrolled 638 healthy subjects (278 males and 367 females) with a mean age of 47.4 ± 16.2 years (range 16-89 years; females 47.7 ± 16.6 years, males 47.0 ± 15.8 years). The functional sensitivity at 10%CV of TnI-Ultra method, performed by repeatedly measuring (n=20) 15 plasma samples with cTnI concentration from 0.02 $\mu\text{g/L}$ to 2.8 $\mu\text{g/L}$, was 0.067 $\mu\text{g/L}$. The distribution of cTnI values approximated a log-normal distribution with a calculated 99th percentile of 0.072 $\mu\text{g/L}$. In 145 samples (22.7%, 138 women and 17 men) we found values less than 0.004 $\mu\text{g/L}$ (i.e., undetectable cTnI concentration), and so an arbitrary concentration of 0.001 $\mu\text{g/L}$ was attributed to these samples. A significant difference was found between the cTnI values in men and women (men: mean 0.015 $\mu\text{g/L}$, median 0.012 $\mu\text{g/L}$, range 0.001-0.196 $\mu\text{g/L}$; women: mean 0.013 $\mu\text{g/L}$, median 0.010 $\mu\text{g/L}$, range 0.001-0.130 $\mu\text{g/L}$; $p < 0.0001$ by Mann-Whitney U test). A highly significant correlation was also found between log-transformation cTnI values and age ($R = 0.261$, $p < 0.0001$ by Spearman rank correlation coefficient test). In a multiple linear regression analysis model, both age and gender (assigned value 2 for males and 1 for females) significantly contributed to regression with cTnI (log transformation values), considered as dependent variable ($\log \text{cTnI} = -3.011 + 0.007 \text{ Age} + 0.267 \text{ Gender}$; $R = 0.427$, $p < 0.0001$). Our study indicates that the new generation immunoassay ADVIA TnI-Ultra is able to measure a detectable concentration of cTnI in more than 70% of healthy subjects with a ratio of 10% CV concentration to 99th percentile limit less than 1 as recommended by international guidelines.

138

TREE-YEARS RESULTS FROM THE CARDIOORMOCHECK: AN EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEME FOR BNP AND NT-PROBNP ASSAYSC. Prontera¹, M. Zaninotto², A. Clerico¹, A. Pilo¹, M. Plebani², L. Sciacovelli³, G. Zucchelli¹¹CNR, Istituto di Fisiologia Clinica, Pisa²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Policlinico Ospedale Università, Padova³Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto

It is known the important role of BNP and NT-proBNP measurement in patients with congestive heart failure (CHF). Their measurements have been recommended by some important International Scientific Societies of Cardiology and the use of these biochemical markers is diffused in many laboratories. 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 since 2005, 100 laboratories, assayed 8 control samples/year at different natriuretic peptides concentration (prepared from plasma-EDTA or plasma Li-heparin residual after routine analysis). Statistics of the collected results were computed and periodic and cumulative reports are prepared and circulated through the EQAS-CNR web-site and by mail. The methods most used by the laboratories were for BNP: Centaur Bayer (12 labs), TRIAGE Biosite (13 labs), Access Beckman (10 labs), AxSYM Abbott (7 labs); Cis-Bio IRMA (5 labs) for NT-proBNP: Elecsys Roche (24 labs), Dimension Dade-Behring (5 labs), Modular Roche (12 labs). Imprecision of NT-proBNP was about 5% (CV within-method, between-lab) for Elecsys and Modular and about 10% for Dimension; the imprecision of BNP assays was worse: 7-15% (CV within-method, between-lab) for Access and Centaur and about 20% for the point-of-care technique Biosite. As far as accuracy is concerned, the results collected in the EQA scheme confirm that BNP assays are affected by large systematic differences between-method while the agreement of the NT-proBNP measurements is much better.

139

VALORI DI ISCHEMIA MODIFIED ALBUMIN IN UNA POPOLAZIONE DI SOGGETTI SANIE. Novello¹, M. M. Mion¹, M. Zaninotto¹, S. Altinier¹, C. Lo Cascio², M. Plebani¹¹*Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera - Università di Padova, Padova*²*Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore di Verona, Verona*

L'Ischemia Modified Albumin (IMA) è stata proposta come marcatore biochimico precoce di ischemia. In questo studio è stata valutata la distribuzione dei valori di IMA in una popolazione di soggetti sani, la correlazione dei valori di IMA con quelli di albumina, l'applicabilità di un "fattore correttivo" recentemente proposto per ridurre la variabilità analitica della determinazione dell'IMA (1).

Materiali e metodi. Sono stati arruolati nello studio 193 soggetti sani (113 maschi+80 femmine; età: range, 50° percentile=18-64, 36 anni) in base ai parametri ematochimici e ai dati anamnestici. I valori di IMA (KU/L, ACB Test, Ischemia Technologies, USA) e di albumina (g/L) sono stati determinati su siero mediante l'utilizzo dell'analizzatore Roche/Hitachi Modular System P (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Fattore correttivo proposto: valore di "IMA corretto"=(valore di albumina del paziente/50° percentile dei valori di albumina della popolazione) x valore di IMA misurato.

Risultati. Range (50°-95° percentile): IMA=68-125 (96-110); albumina=37-54 (47-52); "IMA corretto": 74-116 (94-109). Regressione lineare: Albumina = -0.22 IMA misurata + 67.47 ($r^2=0.31$), $p<0.0001$. Confronto maschi vs femmine: IMA, $p=0.1401$, "IMA corretto", $p=0.1126$ (Mann-Whitney).

Conclusioni. E' stata osservata una correlazione statisticamente significativa tra i valori di IMA e di albumina. Sia il 95° percentile dei valori di IMA "misurata" (110) che di IMA "corretta" (109) risultano considerevolmente più elevati di quanto dichiarato dal produttore (85). I valori di IMA misurata nei maschi e nelle femmine non risultano statisticamente diversi. L'applicazione di un fattore correttivo che normalizza i valori di IMA per quelli di albumina non sembra ridurre sostanzialmente la dispersione dei dati osservati nella determinazione dell'IMA misurata col test ACB.

Bibliografia

1. Standardization of ischemia-modified albumin testing: adjustment for serum albumin. Lippi G. et al. Clin Chem Lab Med 2007;45(2):261-2.

140

CIRCULATING ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS AND INFLAMMATION IN PATIENTS BEFORE AND AFTER CARDIAC SURGERYF. Cesari¹, R. Caporale², R. Marcucci¹, A. Gori¹, A. Capalbo¹, S. Cacioli³, P. Stefano³, G. Messeri², R. Abbate¹, G. Gensini¹¹*Department of Medical and Surgical Critical Care, Thrombosis Centre, University of Florence; Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence*²*Central Laboratory, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence*³*Department of Heart and Vessel, Unit of Cardiac Surgery, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence*

Introduction. Endothelial progenitor cells (EPCs) are bone marrow-derived progenitor cells which possess the capacity to home to sites of vascular injury. Aim of the study was to assess the variations of EPCs in relation to inflammatory markers in patients undergoing cardiac surgery.

Methods. In 38 CABG (group A) and in 54 patients who underwent a valve replacement (group B) the numbers of EPCs and IL6, IL8, IL10, IL1Ra, VEGF, high sensitivity CRP and NT-ProBNP levels were determined pre-surgery (T1), and at 3 (T2) and 10-15 days after surgery (T3). Peripheral blood EPCs were defined as CD34+KDR+, CD133+KDR+ and CD34+CD133+KDR+ by flow cytometry.

Results. EPCs did not significantly differ between group A and B at T1 and at T2. At T2, EPCs significantly decreased both in group A and B [CD34+KDR+: 0.24 (0-2.69) cells/l vs 0.14 (0-0.75) cells/l; CD133+KDR+: 0.23 (0-2.65) cells/l vs 0.12 (0-0.68) cells/l; CD34+CD133+KDR+: 0.17 (0-2.93) vs 0.10 (0-0.57)] cells/l. Moreover, a significant increase of all cytokines and NT-ProBNP was observed between T1 and T2 in both groups, whereas a significant inverse correlation between of EPCs' number and NT-ProBNP after cardiac surgery was detected (CD34+/KDR+: $r = -0.22$, $p=0.04$; CD133+/KDR+: $r = -0.24$, $p=0.03$; CD34+/CD133+/KDR+: $r = -0.25$, $p=0.02$). At T3 EPCs significantly increased with respect to T2 in both groups [CD34+KDR+: 0.14 (0-0.75) cells/l vs 0.27 (0-1.65) cells/l; CD133+KDR+: 0.12 (0-0.68) cells/l vs 0.25 (0-1.09) cells/l; CD34+CD133+KDR+: 0.10 (0-0.57) vs 0.17 (0-1.58)] cells/l. At a multiple linear regression model IL-10 and IL1ra were reported to be significant predictors of EPCs at T3.

Conclusion. In conclusion, we documented a significant association between cardiac surgery and modifications of EPCs' number, by showing, for the first time, that IL-1ra and IL-10 are significant predictors of the EPCs' number at T3. Furthermore, our findings suggest a role for NT-pro BNP in reducing the number of circulating EPCs.

141

INFLUENCE OF AGE AND SEX ON DIMENSION RXL NT-PROBNP CIRCULATING PLASMA LEVELS IN HEALTHY PEDIATRIC SUBJECTS

F. Di Serio¹, V. Cecinati², E. Cleopazzo¹, V. Ruggieri¹, D. De Mattia², N. Santoro²

¹U.O. Patologia Clinica I, Policlinico Bari

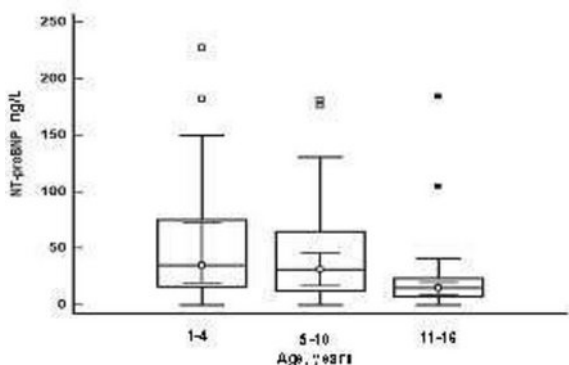
²Clinica Pediatrica F. Vecchio, Dipartimento di biomedicina dell'età evolutiva, Policlinico Bari

Aim. To evaluate the influence of age and sex on NTproBNP circulating plasma levels in a pediatric population.

Method. 107 lithium-heparin plasma samples were collected from healthy Caucasian pediatric subjects aged 1-16 years (52 male) and plasma levels of NT-proBNP were measured with Dimension-RxL method within one hour. All subjects had been without any medical treatment for at least 30 days and alterations of hematochemical parameters; cTnI was $<0.07 \mu\text{g/L}$ (Dimension-RxL cTnI URL). Quantitative variables were summarized by median, interquartile range (IQR) and 97.5th percentile; a Kruskal 1-way ANOVA by ranks model was performed, with NT-proBNP levels as dependent variable.

Results. The NT-proBNP values were divided into three age groups according to sex: age groups: 1-4 years (n=27; M=13); 5-10 years (n=44; M=23); 11-16 years (n=36; M=16). The distribution of NT-proBNP values (Figure) showed a statistically significant decrease for each age group (F=11.4; p=0.0032); no significant difference was detected between sex (F=0.27; p=0.6). Post-hoc analysis showed a statistically significant difference (p <0.05) in NT-proBNP values between groups aged 1-4 and 11-6 years. Median (95% CI), IQR and 97.5th percentile of the distribution of NT-proBNP concentrations: 35 (19-73), 58 and 219 ng/L (subgroup aged 1-4 years); 31 (16-45), 52 and 178 ng/L (subgroup aged 5-10 years); 15 (9-20), 15 and 152 ng/L (subgroup aged 11-16 years).

Conclusion. In contrast to the adult reference population, the NT-proBNP values decreased in healthy children with increasing age, independently of their sex. In studies involving pediatric subjects, age matched reference values should be considered.



142

THE EFFECT OF HAEMODIALYSIS ON TRADITIONAL AND INNOVATIVE CARDIAC MARKERS.

M. Montagnana¹, G. Lippi¹, N. Tessoro², G. L. Salvagno¹, M. Gelati¹, A. Lupo², G. C. Guidi¹

¹Sez. di Chimica Clinica, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona

²Sez. di Nefrologia, Dip. di Scienze Biomediche e Chirurgiche, Università di Verona

Background. Coronary artery disease (CAD) is commonplace in subjects with impaired renal function and cardiovascular disease (CVD) represents the leading cause of mortality in these patients (1). The diagnostic approach to the acute coronary syndrome (ACS) is challenging, since most serum biomarkers are commonly increased in this clinical setting.

Methods. Cardiac troponin T (cTnT), creatine kinase isoenzyme MB (CK MB), myoglobin and Ischemia Modified Albumin (IMA), were assayed in 45 patients pre- (pre-HD) and post-haemodialysis (post-HD), and results were adjusted for haemoconcentration. Pre- and post-dialysis measurements were compared using the Wilcoxon matched-pairs test and data are reported as median (95% confidence interval).

Results. The pre-HD values of serum IMA and cTnT were above the respective diagnostic thresholds (IMA $<85 \text{ kU/L}$; cTnT $<0.03 \text{ ng/mL}$) in 6 (13%) and 27 (60%) patients undergoing chronic HD. A significant (105.0 vs 79.0 kU/L, p<0.0001) and variable (+38%; 95% CI: 12% to 65%) increase of serum IMA was observed post-HD, whereas the other biomarkers significantly decreased (cTnT: 0.029 vs 0.044 ng/mL, p=0.016; CK MB: 2.33 vs 2.50 $\mu\text{g/L}$, p<0.001; myoglobin: 128.1 vs 148.7 $\mu\text{g/L}$, p<0.001).

Conclusions. Biomarkers of myocardial injury, especially cTnT and IMA, might be used in HD patients, provided that values are interpreted according to the appropriate diagnostic thresholds and kinetics. IMA might be reliably applied to stratify the long-term risk of these patients, but not for diagnosing ACS during or immediately post-HD.

Reference

1. Charytan D, Kuntz RE, Mauri L, DeFilippi C. Distribution of coronary artery disease and relation to mortality in asymptomatic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2007;49:409-416.

	Pre-dialysis	Post-dialysis	p
cTnT, ng/mL	0.044 (0.037-0.071)	0.029 (0.032-0.059)	0.016
IMA, Kunits/L	79 (75-80)	105 (103-109)	<0.0001
CK-MB, $\mu\text{g/L}$	2.50 (2.58-3.25)	2.33 (2.33-2.97)	<0.0001
Myoglobin, $\mu\text{g/L}$	149 (128-229.2)	128 (121-186)	<0.0001

143

TROPONIN I RELEASING IN UNSTABLE ANGINA: CELLULAR DAMAGE OR INCREASED CELLULAR PERMEABILITYM. Scorretti¹, B. Viva¹, V. Esposito¹, C. Papetti¹, G. M. Lagravinese¹¹UOSD Laboratorio di Emergenza, Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Roma

The aim of our study is to understand which modification could occur in the cellular structure of cardiomyocyte in response of a moderate ischemic damage. A such event usually lead to a partial release of cytoplasmatic proteins (Troponin I) and enzymes in the general circulation. We investigate 737 patients who reached the E.R. complaining for chest pain. All patients reached ER in 200 minutes from the onset of painful symptomatology. Each patient has been submitted to clinical evaluation and laboratory evaluation. The laboratory investigation included evaluation of the serum level of Troponin I, Myoglobin and CK-MB mass, respectively at the admittance and after 4-8-12-24-36 hours. We defined two cut off values for Troponin I. First cut off value is 0,1 ng./ml. The second cut off values is 0.5 ng./ml. Only patients with values up the Troponin I cut off, after the second blood withdraw, has been moreover investigated at 8-12-24-36 hours. Accordingly with the results, we divided patients in three groups: Group A-461 pts (62%)- Negative for Troponin I at first and second blood sample. Group B-173 pts (23%)-Serum Troponin I between 0.12 ng./ml and 0.35 ng./ml. Group C-113 pts (15%)- Serum Troponin I up to 0.5 ng./ml (predictive of AMI). We focused our attention about the Group B that show only little modifications of the serum level Troponin I up his first cut off value. We observed that modifications have a very short duration, beginning early during the first 6 hours-from the pain onset-and going slowly ending no more late than 8-12 hours from the first blood sample. During those modifications neither Myoglobin or CK-MB showed pathological modifications or oscillations up their respective cut off values. We concluded that the low oxygen cellular level following a moderate ischemic event could be responsible for transient and reversible membrane damage (increased permeability and blebbing). That lead to release exclusively small amount of cytoplasmatic neo synthesized Troponin I. The very small dimension of Troponin I molecular structure could explain why Troponin I (differently of Myoglobin and CK-MB), for a short time, selectively pass through the membrane reversibly damaged.

144

ACCESS AccuTnI SU UNICEL Dxl 800: PROFILO DI IMPRECISIONE E CUT-OFF CLINICOM. M. Mion¹, M. Zaninotto¹, E. Novello¹, S. Altinier¹, M. B. Rocchi², D. Sisti², M. Plebani¹¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova²Istituto di Biomatematica Università "Carlo Bo" di Urbino, Urbino

Introduzione. Il documento ESC/ACC (2000) per la diagnosi di necrosi miocardica acuta suggerisce di adottare come livello decisionale la concentrazione più bassa di troponina cardiaca (cTn) I e/o T (cTnI, cTnT) per la quale il dosaggio impiegato abbia una variabilità analitica (CV) massima del 10%.

Scopo dello studio. Valutare le prestazioni analitiche e strumentali (profilo di imprecisione, 10% CV) del metodo di ultima generazione Access AccuTnI, su un nuovo tipo di analizzatore automatizzato, l'Unicel Dxl 800 (Beckman Coulter, Milano) e di verificarne l'applicabilità diagnostica al livello decisionale (99° percentile di una popolazione di riferimento sana).

Materiali e Metodi. L'imprecisione analitica è stata valutata secondo il protocollo NCCLS EP5-A (2 repliche di 11 pools a differente concentrazione per 20 giorni non consecutivi; 3 livelli di materiale di controllo QC 1,2,3 all'inizio e alla fine di ogni seduta analitica). Il profilo ottenuto è stato poi elaborato statisticamente per il calcolo della concentrazione di cTnI ($\mu\text{g/L}$) al 10% CV e il corrispondente intervallo di confidenza (95% CI) mediante regressione iperbolica e successiva linearizzazione rispettivamente.

È stato calcolato il livello decisionale corrispondente alla concentrazione di cTnI al 99° percentile di una popolazione di 398 soggetti sani (301 maschi e 97 femmine; età: range, mediana=18-64, 41 anni). L'analisi statistica è stata eseguita mediante Bootstrap technique.

Risultati. Tutti i dosaggi sono stati eseguiti su siero ed espressi in $\mu\text{g/L}$. Concentrazione e CV% range: QC=0.055-1.188, 8.50-13.74%; Pools=0.018-0.083, 6.88-22.89%. cTnI corrispondente al 10% CV: 0.058 (95% CI=0.047-0.075) ($p<0.001$). 99° percentile: 0.036 (95% CI=0.031-0.049), CV corrispondente: 12.97%.

Conclusioni. Le prestazioni analitiche osservate per il metodo Access AccuTnI applicato all'analizzatore Unicel Dxl 800 sono risultate soddisfacenti e confrontabili con quelle di altri sistemi automatizzati. Tuttavia, poiché la concentrazione al 10% CV differisce dal 99° percentile, come livello decisionale per la diagnosi di necrosi miocardica è preferibile utilizzare la concentrazione di cTnI al 10% CV.

145

INCREASED CHROMOSOMAL DNA DAMAGE IS PREDICTOR OF FUTURE ADVERSE CARDIAC EVENTS IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

N. Botto¹, C. Federici¹, S. Manfredi¹, I. Foffa¹, M. S. Parri¹, A. Rizza¹, A. Clerico¹, M. G. Andreassi¹

¹Lab. *Biologia Molecolare e Genetica, IFC-CNR, Osp. Pasquinucci, Massa, Italy*

Background. Somatic DNA damage has been associated to both early phase and/or acute complications of atherosclerosis. It remains unclear whether circulating levels of chromosomal DNA damage have an independent prognostic value in patients with coronary artery disease (CAD).

Objectives. The aim of the study was to assess the prognostic significance of chromosomal DNA damage in human lymphocytes on the rate of Major Adverse Cardiovascular Events (MACE) in patients with coronary artery disease (CAD) by using micronucleus (MN) assay as a sensitive biomarker of genetic instability.

Methods. Between March 1999 and June 2001, we carried out a long-term follow-up prospective study in a group of 178 consecutive patients (153 males; age=61.9±9.7 years), who underwent MN assay before coronary angiography.

Results. During a mean follow-up of 51.4±23.8 months, 58 patients had adverse MACE (cardiac death, myocardial infarction, stroke, congestive heart failure, unstable angina, coronary and peripheral revascularization). The overall event-free survival was 77.5%, 70.4% and 49.0% in patients with the low, medium and upper tertiles of MN, respectively (log rank: 11.5 p=0.003). On multivariate Cox regression model, only the upper tertiles were significantly associated with a higher risk of MACE [HR=2.2 (1.1-4.7); p=0.03].

Conclusion. Peripheral DNA damage levels may be a new sensitive biomarker of prognostic stratification in patients known CAD. DNA biomarkers might be novel predictors of future cardiovascular events over traditional risk factors.

146

IN EBM A CIASCUNO IL SUO: AL LABORATORISTA LE PERFORMANCE ANALITICHE E I LIKELIHOOD RATIO, AL CLINICO LE PROBABILITA' PRE-TEST: GLI ORMONI NATRIURETICI CARDIACI (CNHs)

P. Pauri¹, F. Argentati¹, B. Brunella¹, C. Martini¹, G. Romano Giamba¹, S. Secondini¹, T. Trenti²

¹Unità Operativa Patologia Clinica, Ospedale di Jesi (AN), Zona Territoriale 5, ASUR Marche

²Gruppo di lavoro EBLM SIBioC

Gli studi sull'efficacia clinica dei CNHs sono numerosi e l'aumento del loro uso nella pratica clinica è esponenziale. Una recente metanalisi (Clerico, Clin Chem 2007) confronta l'accuratezza diagnostica dei diversi saggi commercialmente disponibili per BNP e NT-proBNP segnalandone la rilevanza clinica nello scompenso cardiaco acuto (AHF) e cronico (CHF). Gli AA sottolineano la notevole disomogeneità degli studi analizzati, soprattutto per quanto riguarda la scelta del gold standard di riferimento.

L'EBLM sostiene il ruolo del Laboratorio nell'appropriatezza della richiesta e nella descrizione delle caratteristiche dei test utilizzati, allo scopo di comunicarne i limiti e il valore nel paziente individuale. Per il clinico la conoscenza delle probabilità pre-test è fondamentale per interpretare correttamente i risultati di un test.

Nell'ottica di introdurre un test CNH nella nostra realtà, abbiamo fatto una esercitazione EBLM, calcolando, per i test di lavori significativi in letteratura, i Likelihood ratio (LR), rapporti che esprimono la verosimiglianza del risultato di un test positivo (LR+) o negativo (LR-). Utilizzando nel nomogramma di Fagan questi valori per il calcolo delle probabilità di malattia in diverse situazioni, si ottengono risultati che meritano attenzione. Nella popolazione generale inferiore a 65 anni, con probabilità di CHF <1%, un risultato positivo ha moltissime probabilità (>90%) di essere un falso positivo, mentre un risultato negativo esclude al 100% la malattia. Nella popolazione generale >65 anni, con prevalenza 10%, le probabilità di falsi positivi sono ancora alte (70%) mentre quelle di falso negativo sono il 4%. Il discorso cambia per valori molto alti di BNP (> 3 volte il cut-off) in cui LR+ diventa > 50.

In conclusione, usando CNHs, partendo da basse probabilità di CHF, moltissimi soggetti positivi al test potrebbero essere sottoposti ad accertamenti costosi e/o rischiosi per escludere una malattia cardiaca che non hanno. Se invece si parte da un sospetto clinico forte, le probabilità di malattia con test negativo rimangono alte (70%). Dobbiamo quindi cambiare l'ottica con cui valutiamo le performance analitiche, collaborando con i clinici per costruire nuovi approcci basati sulle probabilità pre-test.

147

ELEVATED LEVELS OF HIGH-SENSITIVITY C-REACTIVE PROTEIN AND HOMOCYSTEINE IN YOUNG HEALTHY WOMEN ACCORDING TO ORAL CONTRACEPTIVE USE

S. Cauci¹, M. Di Santolo¹, G. Stel², J. Culhane³, F. Gonano², S. Guaschino⁴

¹Dept. Biomedical Sciences and Technologies, School of Medicine, Univ. Udine, Italy

²Dept. Experimental and Clinical Pathology and Medicine, School of Medicine, Univ. Udine, Italy

³Dept. Obstetrics and Gynecology, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA, USA

⁴Dept. Reproductive and Development Sciences, School of Medicine, Univ. Trieste, Italy

Background. High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and homocysteine (HCY) are independent markers to assess risk for cardiovascular disease (CVD). Our aims were to evaluate the impact of current generation OC pills on these serum markers in a population of young fertile non obese women.

Methods. A total of 277 young healthy Caucasian Italian women [mean age, 23 years; body mass index (BMI), 21 kg/m²] were analyzed. Progressive cut-offs of hsCRP and HCY levels were evaluated in OC users compared to non-OC users.

Results. OC users were 27.8% (77/277) of the study population. OC users were 4-fold more likely than non users to have levels of hsCRP from 3 to 10 mg/L at risk for CVD, $P < 0.001$. Third generation OC use was also associated with nearly 4-fold increased levels of hsCRP in the range 1- <3 mg/L, at intermediate risk for CVD, $P < 0.001$. Conversely, non-OC users were 9 times more likely to show protective levels of hsCRP < 0.5 mg/L. Of interest, OC use did not significantly affect HCY levels. Notably, OC use increased serum triglycerides ($P < 0.001$) and total cholesterol ($P = 0.001$), however HDL not LDL cholesterol had augmented concentrations in OC users.

Conclusions. Third generation of OC pills markedly increase low-grade inflammatory status as assessed by hsCRP concentrations. Our findings suggest monitoring of hsCRP even in young normal-weight healthy OC users to assess the risk of thrombosis and cardiovascular diseases. OC may potentially increase the risk of myocardial infarction in the young female population.

148

OSTEOPONTIN: A POSSIBLE MARKER OF VASCULAR DAMAGE

S. Del Ry¹, M. Maltinti¹, C. Colotti¹, C. Prontera¹, E. Rizza¹, A. M. Mazzone¹, M. Emdin¹, D. Giannessi¹, D. Neglia¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy

Background. Dilated cardiomyopathy (DCM) is associated with clinical, genetic and metabolic mechanisms; it is possible to suppose a relation between endothelial/vascular and myocardial damage mechanisms and markers of coronary and myocardial microvascular function.

Aim. To measure, in DCM patients, the plasma levels of osteopontin (OPN), a extracellular matrix protein involved in the acute and chronic inflammatory vascular response, of B-type natriuretic peptide (BNP), a known marker of ventricular dysfunction as well as of other biomarkers in order to evaluate their relationship with coronary microvascular function, assessed by Positron Emission Tomography (PET).

Methods. Biomarker plasma levels were studied in controls (n=64) and in DCM patients classified according to the ACC/AHA Guidelines: A) n=9, EF \geq 50%, NYHA I; B) n=12, EF $<$ 50%, NYHA I; C) n=54, NYHA II-III.

Results. Plasma levels of biomarkers were significantly increased in patients with respect to healthy controls (OPN: 502.3 \pm 28.0 ng/ml vs. 426.9 \pm 16.4 ng/ml, $p = 0.03$; BNP: 107.79.4 \pm 16.4 pg/ml vs. 9.4 \pm 1.4 pg/ml $p < 0.001$; IL-6: 1.56 \pm 0.25 pg/ml vs. 0.64 \pm 0.21 pg/ml, $p < 0.001$). Unlike BNP, no relationship was found between OPN and left ventricular ejection fraction (LVEF) and between LV end-diastolic dimension (LVEDD).

BNP was significantly increased in DCM patients with respect to A, B, C class: (16.2 \pm 4.6 pg/ml; 72.9 \pm 34.8; 134.1 \pm 21.1 $p < 0.001$ B and C vs. controls $p = 0.03$ A vs. B, $p < 0.0001$ A vs. C) while no difference was observed in OPN plasma levels.

A significant negative correlation was found between OPN and myocardial blood flow (MBF) at rest ($r = 0.435$, $p = 0.01$), during dipyridamole stress (MBF D) ($r = 0.65$, $p < 0.0001$) and with MBF reserve ($r = 0.47$, $p = 0.008$) while only a mild correlation was observed between BNP and MBF D ($r = 0.30$, $p = 0.034$).

Conclusions. The different behaviour of BNP and OPN with respect to parameters of LV function and of coronary microvascular function confirms the hypothesis that OPN could be a marker of endothelial damage and that its plasma levels could be related with coronary vascular function, possibly expressing an inflammatory vascular damage.

Reference

Okamoto H. Osteopontin and cardiovascular system. *Moll Cell Biochem.* DOI 10.1007/s11010-006-9368-3.

149

IL RUOLO DEL TECNICO DI LABORATORIO NELLA IMPLEMENTAZIONE E GESTIONE DEI POINT-OF-CARE PER MARCATORI CARDIACIV. Rosato¹, A. Mazzarella¹, C. Palumbo¹, I. Specchia¹, P. Valentino¹, F. Di Serio¹¹U.O. Patologia Clinica I, Policlinico, Bari

Scopo del lavoro. Organizzare un sistema di Point-of-Care (POCT) per marcatori cardiaci in considerazione degli standards di eccellenza.

Materiale e metodi. Lo Stratus CS (Dade-Berhing) è stato individuato come POCT per marcatori cardiaci ed il personale tecnico si è fatto carico di eseguire i protocolli analitici atti a valutare la performance del metodo Troponina I. Sono stati individuati i compiti e responsabilità degli operatori ed in particolar modo del POCT Supervisor (Caposala), cui fa capo il personale effettuante le indagini (Infermieri) e dei POCT Supervisor Tecnici. Il Supervisor Caposala ha il compito di provvedere alle necessità di approvvigionamento del POCT mentre gli Infermieri hanno la responsabilità dell'esecuzione quotidiana del check strumentale e dei Controlli di Qualità, dell'accettazione informatizzata dei pazienti, dell'esecuzione del prelievo e all'analisi del campione biologico. I Tecnici del POCT sono responsabili della esecuzione dei protocolli di validazione analitica dei nuovi metodi, delle calibrazioni e manutenzioni programmate e delle attività di supporto in caso di necessità. Tutti i processi si svolgono in conformità con le procedure codificate nel manuale della qualità.

Risultati. Dal 01/01/05 al 31/05/07 sono stati implementati 3 POCT per marcatori cardiaci dislocati nei tre dipartimenti di cardiologia della nostra istituzione: di ogni sistema sono responsabili due differenti tecnici di laboratorio. Nello stesso periodo sono stati valutati 13.300 pazienti con sindrome coronarica acuta: i markers cardiaci erano disponibili ai clinici con un TAT medio di 18 min. Nessun malfunzionamento causa di fermo strumentale era registrato. I singoli POCT, organizzati in considerazione e nel rispetto degli standards di Qualità e di Eccellenza, sono stati accreditati dal Clinical Pathology Accreditation e certificati secondo le norme ISO 9001-2000.

Conclusioni. La nostra esperienza suggerisce che per la realizzazione di un POCT che garantisca la qualità dei risultati prodotti, è necessario un alto grado di integrazione e di condivisione di obiettivi tra personale Tecnico di laboratorio e personale Infermieristico di reparto.

150

POLIMORFICI GENETICI NEL PROTO-ONCOGENE RET: LIMITI E POSSIBILE APPLICAZIONI NELLA DIAGNOSTICA DI LABORATORIOA. Minucci¹, P. Concolino¹, C. Carrozza¹, C. Zuppi¹, B. Giardina¹, E. Capoluongo¹¹Dipartimento di Biochimica Clinica Policlinico Universitario A. Gemelli

Introduzione. Il proto-oncogene RET è normalmente espresso dalle cellule che prendono origine dalla cresta neurale. Esso codifica per un recettore tirosin-chinasi essenziale durante l'embriogenesi per lo sviluppo iniziale del sistema nervoso centrale, del simpatico e del parasimpatico. Mutazioni germinali che inattivano il gene sono responsabili dello sviluppo della malattia di Hirschsprung (HSCR), mentre mutazioni che lo attivano causano tumori e sindromi cancerose, come la neoplasia endocrina multipla di tipo 2 (MEN), e il tumore midollare delle cellule tiroidee.

Metodi. Su 31 pazienti afferenti al nostro laboratorio è stato eseguito lo studio del gene RET mediante sequenziamento degli esoni 10-11-13-14-15-16 e dei rispettivi siti di splicing.

Risultati. I risultati hanno evidenziato una sola mutazione (S891A = 3.2%) in due sorelle, mentre in 22 pazienti è stato evidenziato almeno un polimorfismo. Tutti i pazienti sono risultati wild-type per gli esoni 10 e 16 e per i siti di splicing degli esoni studiati. Per gli altri esoni i risultati sono stati i seguenti: esone 11: 11 pazienti presentavano G691S (9 in eterozigosi); esone 13: 13 pazienti presentavano L769L (11 eterozigoti); esone 14: 5 pazienti (tutti in eterozigosi) presentavano S863S; esone 15: 11 pazienti presentavano S904S (9 in eterozigosi). L769L è risultato il polimorfismo più frequente, mentre la più bassa prevalenza riguarda il polimorfismo S863S. I genotipi più frequenti sono risultati il G691S/S904S e L769L/S863S.

Conclusioni. In patologie complesse, siti polimorfici possono essere associati con lo sviluppo della malattia, modificando il rischio di insorgenza. Negli ultimi anni diversi gruppi hanno utilizzato gli SNPs del RET protoncogene per determinare se le varianti polimorfiche possono rappresentare alleli a bassa penetranza predisponenti i disordini associati a tale gene. I dati riportati in letteratura risultano attualmente discordanti. Per questo motivo, in assenza di indicazioni chiare da parte della letteratura, il test andrebbe eseguito solo sui candidati selezionati dopo opportuna consulenza genetica, ipotizzando, come previsto dalle linee guida più recenti, l'estensione del test all'intera regione codificante, nel caso di negatività del test di I livello.

151

PRELIMINARY PROTEOMIC PATTERNS OF NORMAL AND RENAL CELL CARCINOMA HUMAN SAMPLES BY MALDI MS-BASED PROFILING

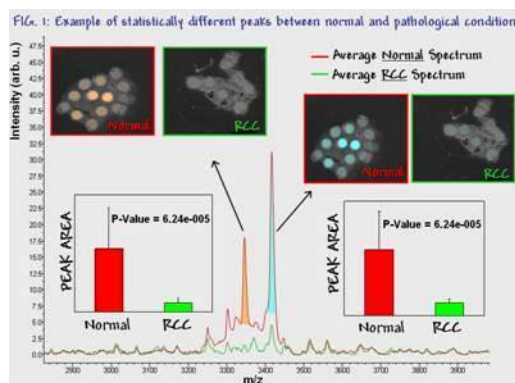
C. Chinello¹, V. Mainini¹, E. Gianazza¹, A. Di Fonzo¹, C. Galbusera¹, N. Bosso¹, F. Magni¹

¹Dep. of Experimental Medicine, University of Milano-Bicocca, Monza, Milan, Italy

The direct analysis of tissues using MALDI-MS enables both endogenous and exogenous compounds to be detected with high molecular specificity while maintaining their spatial orientation. Profiling (low resolution) and imaging (high resolution) are the two main protocols used. Profiling are designed to make comparisons between groups, such as different physiological conditions, and involves analyzing discrete areas of tissue sections and subjecting the resulting protein profiles to biostatistical analysis. Alternatively, imaging allows protein localization differences between and among samples to be rapidly assessed, thus providing real images where peptides and proteins distributions are visualized (1). In order to investigate Renal Cell Carcinoma (RCC) signatures, we have applied MALDI profiling technique to normal and RCC tissue slices and primary cell cultures belonging to adjacent normal and diseased tissue, and preliminary results will be here reported. Frozen tissue sections obtained from nephrectomised patients and cells from primary cultures were put onto conductive glass slides and matrix were spotted in small droplets directly on the samples. They were inserted by an adapter target plate in a Reflex IV MALDI-TOF operating in linear mode. The resulting average spectra are processed with the ClinProTools software to discover the discriminating features between normal and pathological patterns. In both cases peaks with significant different intensities between the two physiological conditions were found (an example is shown in Fig.1), thus providing potential candidates for further investigation.

References

1. Chaurand, P., et al., *Am J Pathol*, 2004. 165(4): p. 1057-68.



152

PROGNOSTIC VALUE OF NICOTINAMIDE N-METHYLTRANSFERASE EXPRESSION LEVELS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

D. Sartini¹, A. Santarelli², V. Rossi¹, G. Goteri³, C. Rubini³, D. Ciavarella⁴, L. Lo Muzio⁴, M. Emanuelli¹

¹Ist. di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

²Ist. di Scienze Odontostomatologiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

³Dip. di Neuroscienze, Sez. di Anatomia Patologica e Istopatologia, Università Politecnica delle Marche, Ancona

⁴Dip. di Scienze Chirurgiche, Università di Foggia, Foggia

Squamous cell carcinoma is the most common cancer type of the oral cavity, representing 90% of all oral cancers. Despite the advances in surgical techniques and adjuvant therapies, the mortality rate of oral squamous cell carcinoma (OSCC) has shown little improvement over the last three decades. Traditional clinical methods lack sensitivity to detect OSCC at an early time point, and are insufficient to predict the aggressiveness of tumours and disease outcome. To more accurately 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 expression profiling.

We wished to focus on the expression of genes critical in the drug metabolism process, namely on Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT), enzyme involved in the biotransformation and detoxification of many xenobiotics. We investigated NNMT expression levels in tumour and matched adjacent healthy tissue by semiquantitative RT-PCR, quantitative real-time PCR, Western blot and immunohistochemical analyses. Compared with normal mucosa, OSCC exhibited significantly increased expression of NNMT in 11 of 22 (50%) examined patients. Interestingly, NNMT was upregulated in most of the favourable OSCCs (N 0), while no marked NNMT expression alterations between tumour and normal mucosa were detected in most of the unfavourable OSCCs (N+).

Both, pT and pathological staging showed an inverse correlation with NNMT mRNA levels, and interestingly, a significant negative association of the amount of NNMT expressed by tumour tissue compared to the adjacent normal mucosa was found with metastasis (1). The low NNMT expression detected in patients with metastasis supports the hypothesis that NNMT plays a role in tumour expansion, and tumours that downregulate it may be able to evade immunosurveillance and grow. Our results indicate that NNMT expression may be a useful predictor for lymph node metastasis, and that this enzyme is a potential prognostic factor and therapeutic target for OSCC.

References

1. Sartini D et al.(2007) *Mol Med*, in press.

We thank Dr. Richard Weinsilboum for providing NNMT antibody

153

RIDOTTA CONCENTRAZIONE DI 25-OH-VITAMINA D3 IN PAZIENTI CON VARI TIPI DI NEOPLASIE: OSSERVAZIONI PRELIMINARI

G. Falliti¹, L. G. Baldini¹, M. Meo¹, F. Morabito¹, G. R. Filiciotto¹, A. Lanza¹, S. Lo Cascio¹, F. Morabito¹, R. Brancato¹, G. Lenzo²

¹Servizio di Patologia Clinica, Azienda Ospedale Piemonte, Messina

²Laboratorio Analisi Haematologica, Milazzo

Alcuni lavori scientifici hanno riportato una diminuzione della concentrazione serica di 25-OH-Vitamina D3 in Pazienti affetti da tumore al seno. Poiché tra i vari meccanismi alla base di simile riscontro si ipotizza il fatto che la Vitamina D si leghi a cellule immunoregolatrici risultandone, quindi, un decremento serico in Pazienti neoplastici, si è voluto indagare se tale ipotesi potesse essere supportata da ulteriori ed analoghe osservazioni in diversi tipi di neoplasie. È stato dosato il livello serico della 25-OH-Vitamina D3 con tecnica HPLC, strumentazione Agilent 1200, Bio-Rad, in 46 Pazienti in follow-up per vari tipi di neoplasie in differenti organi (Fegato, Colon, Mammella, Prostata, Stomaco, Polmone, Vescica), non sottoposti a terapia addizionale con Vitamina D. I prelievi sono stati eseguiti in un periodo climaticamente omogeneo (influenza del sole) e, contemporaneamente, è stata dosata a tutti i Pazienti la Creatinina serica per escludere patologie renali e conseguente influenza sul metabolismo della Vitamina D. In nessuno dei Pazienti sono state riscontrate anomalie della funzionalità renale e, quindi, alterazioni del metabolismo della Vitamina D. Nei 46 Pazienti investigati, in 8 Pazienti è stato riscontrato un decremento del livello serico di Vitamina D (4 Pazienti con Carcinoma della Mammella, 1 paziente con Adenocarcinoma della Prostata, 2 pazienti con Carcinoma Polmonare ed 1 paziente con Astrocitoma cerebrale) ed in 4, invece, un aumento delle concentrazioni di Vitamina D (Epatocarcinoma con concomitante Epatiti da HBV e HCV). Nonostante il limitato numero di pazienti investigati in questo studio, le informazioni derivanti da queste osservazioni preliminari sembrano indicare un possibile importante ruolo della 25-OH-Vitamina D3 nella immunologia delle neoplasie. È risultata evidente, in particolare, la prevalenza delle basse concentrazioni di Vitamina D in soggetti affetti da Carcinoma della Mammella (a conferma di precedenti osservazioni) e l'aumento notevole delle concentrazioni di Vitamina D nei soggetti con Epatocarcinoma e concomitante Epatiti (B e C) in terapia immunoadiuvante con Interferone

Bibliografia

1. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82:118-122(1997)

154

MIGLIORAMENTO DELL'APPROPRIATEZZA DELLE RICHIESTE DI DOSAGGIO DELL'INDICE fPSA/tPSA MEDIANTE REFLEX TEST

G. Falliti¹, R. Sippelli¹, P. Lo Giudice¹, O. Marullo¹, M. C. Mancuso¹, E. Saja¹, M. Teti¹, S. Codispoto¹, G. Fiorentino¹

¹Servizio di Patologia Clinica, Azienda Ospedale Piemonte, Messina

Introduzione. La richiesta diagnostica inappropriata comporta spese non necessarie, evitabili, ulteriori indagini diagnostiche, abuso o sottoutilizzo di certi test che portano ad una gestione inappropriata dei pazienti. Nel 2006 il Laboratorio ha dosato per i pazienti ricoverati 595 fPSA (24% dei tPSA) ma non tutti i fPSA dosati erano in relazione alla concentrazione del tPSA. Si è proceduto ad un'accurata valutazione statistica con gli obiettivi di: a) pianificare l'utilizzo del reflex test; b) migliorare l'appropriatezza delle richieste di dosaggio dell'Indice fPSA/tPSA; c) razionalizzare le risorse.

Metodi. È stata eseguita una statistica sulle richieste dell'Indice fPSA/tPSA per i pazienti ricoverati nell'anno 2006, calcolando i seguenti parametri: tPSA, fPSA, tPSA patologici con valori compresi tra 4–20 ng/ml, Indice fPSA/tPSA appropriato ed Indice fPSA/tPSA non-appropriato. I dosaggi di fPSA e tPSA sono stati eseguiti in chemiluminescenza su strumentazione Immulite 4000, Medical Systems. Tramite procedura interna è stato concordato con i reparti, nel 2007, di non richiedere il dosaggio di fPSA che viene, invece, eseguito con reflex test per i campioni di tPSA a concentrazione compresa tra 4–20 ng/ml.

Risultati. Nell'anno 2006 erano stati eseguiti 482 Indici fPSA/tPSA non-appropriati (81% dei fPSA dosati in Laboratorio) e solo 113 Indici fPSA/tPSA (19% dei fPSA) erano risultati appropriati. I tPSA patologici (valore compreso tra 4–20 ng/ml), per i quali non era stato richiesto il calcolo dell'Indice fPSA/tPSA, ammontavano a 202 (8% dei tPSA). Nell'arco dei primi 6 mesi del 2007, adottando il dosaggio del fPSA con reflex test, con valori di tPSA compresi tra 4–20 ng/ml, sono stati eseguiti 179 fPSA (13% dei tPSA)

Conclusioni. Grazie al reflex test, in un'ottica di miglioramento dell'appropriatezza delle richieste di fPSA ed Indice fPSA/tPSA, è stato possibile ridurre il numero complessivo dei fPSA dosati (47% in meno) e, soprattutto, eliminare le richieste di Indice fPSA/tPSA non-appropriate. Per una migliore gestione clinica del paziente si è deciso, inoltre, di segnalare ai reparti quei pazienti che presentino valori di tPSA compresi tra 3–4 ng/ml.

Bibliografia

1. Clin.Chem. 44:12,2462–2470(1998).

155

RESULTS OF THE IMPLEMENTATION OF RECOMMENDATIONS FOR APPROPRIATE USE OF TUMOR BIOMARKERS IN A UNIVERSITY HOSPITAL: A SIX-MONTH AUDIT

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

Background. Tumor biomarkers (TBM) are increasingly used to make clinical decisions in oncology, mainly for predicting prognosis, monitoring treatment or detecting disease recurrence and progression. It is, therefore, mandatory to provide evidence-based information both about the optimal use as well as the limitations of these tests to improve appropriateness of their measurement. For this reason we introduced new strategies for optimal use of TBM in our hospital by practice guidelines (1).

Methods. According to the oncologists and in agreement with the available international guidelines, we identified the recommended TBM for any specific clinical goal of different malignancies. As a general rule, we established a maximum of two TBM requests in the same order except for well documented clinical situations. To evaluate the impact of the recommendations, we compared the same 6-month period (July to December) before and after guidelines implementation.

Results. The number of TBM requests decreased from 7181 to 3090 (-57%), with some differences among clinical units, ranging from -75% in the Internal Medicine Department to -24% in the Nephrology Department. Among available TBM, α -fetoprotein showed the highest decrease (from 1316 to 408, -69%) and free PSA the lowest (from 78 to 73, -6.4%). In terms of reagent costs, the laboratory saved € 17,713, 35% of whom only for neuron-specific enolase request decrease. During the evaluated period, 241 orders asking for more than two TBM were discussed with clinicians and all but one, related to a patient affected by two different malignancies, were brought back to the recommendations.

Conclusions. Implementing recommendations on the correct use of TBM in a teaching hospital largely decrease the number of ordered tests and the reagent costs, without any impact on TBM clinical role.

References

1. Panteghini M, Piazza E, Dolci A, et al. Strategie per l'impiego ottimale dei biomarcatori in oncologia: raccomandazioni e protocolli operativi. *Biochim Clin* 2006;30:210-23.

156

ANTIGENE PROSTATICO SPECIFICO (PSA): UNO STUDIO DI INCIDENZA NEL PRESIDIO OSPEDALIERO OCCIDENTALE DELLA ASL TARANTO

M. Laneve¹, L. Tursi¹, C. Mazzone¹, G. Quaranta¹, A. Francavilla¹, C. Cavallo¹, A. Franchino¹, B. Grossi¹

¹Lab. di Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero Occidentale, AUSL Taranto

Scopo del lavoro. L'obiettivo del nostro lavoro è stato la valutazione dei livelli plasmatici di PSA totale nella popolazione di sesso maschile della zona occidentale della provincia di Taranto.

Il PSA totale è un marcatore biologico specifico d'organo ma non della malattia: infatti incrementi sierici si riscontrano sia in patologie benigne della prostata che maligne. Il PSA è prodotto prevalentemente dall'epitelio ghiandolare prostatico ed è indispensabile per la sua fluidificazione e per la mobilità degli spermatozoi.

Livelli sierici di PSA superiori a 4 ng/ml sono associati a patologie prostatiche benigne (prostatiti e ipertrofia prostatica) e maligne (adenocarcinoma prostatico).

Materiali e metodi. Il nostro studio è stato effettuato da giugno 2006 a giugno 2007 presso il Laboratorio di Patologia Clinica del P.O. di Mottola (Lab 1) e del P.O. di Castellaneta (Lab 2), su pazienti (pz) pervenuti nei nostri laboratori, come ricoverati o come ambulatoriali esterni.

Il dosaggio del PSA totale è stato eseguito utilizzando i seguenti analizzatori automatici: a)AxSYM, ABBOTT (EIA); b)Elecsys, ROCHE (Elettrochemiluminescenza).

Risultati. Abbiamo valutato 3732 pz che poi abbiamo così suddiviso, a seconda dei valori di PSA totale nel siero, in tre gruppi: da 0 a 4 ng/ml (gruppo I), da 4 a 10 ng/ml (gruppo II), >10ng/ml (gruppo III) ottenendo i seguenti risultati:

Nel Lab 1 testati 1718 pz così aggregati: gruppo I= 1473 pz; gruppo II= 168 pz; gruppo III= 77 pz

Nel Lab 2 testati 2014 pz così aggregati: gruppo I= 1671 pz; gruppo II= 185 pz; gruppo III= 58 pz

Conclusioni

Su un totale di 3732 pazienti, 578 presentavano valori sierici di PSA patologici (15.5 %). Riaffermiamo perciò l'importanza del laboratorio di patologia clinica nella diagnosi e nel monitoraggio dell'adenocarcinoma prostatico.

Bibliografia

1. Catalona WJ, Loeb S., L'era del PSA non è finita, *Eur Urol Ed. Italiana* 1,2006;
2. American Urological Association, Linee guida per il trattamento della IPB, vol 170,2003

157

THE USEFULNESS OF TPA AND TPS ASSAYS IN RECTAL CANCER

P. Mariani¹, M. D'Alessandro¹, G. Lezoche², D. Collepardo¹, A. Bachetoni¹, A. Rotundo², P. Ursi², E. Lezoche²

¹U.O. Patologia Clinica A, Dip. Chirurgia Generale "P. Stefanini", Sapienza Università di Roma

²U.O. Chirurgia Endolaparoscopica, Dip. Chirurgia Generale "P. Stefanini", Sapienza Università di Roma

The usefulness of cytokeratin tumor markers is well established for the epithelial carcinomas follow-up. The cytokeratins reflect neoplastic cell activity. Thus, by monitoring patients with repeated determination of a cytokeratin marker in combination with a marker that characterizes tumor burden, the clinicians can obtain relevant information about tumor growth. Cytokeratins are not "organ specific", which limits their diagnostic utility; however, their use in monitoring patients during treatment (radiotherapy, endocrine therapy and chemotherapy) and after therapy has been concluded, the cytokeratins may be of benefit to detect the onset of metastatic disease.

The aim was to evaluate if TPS is a reliable primitive diagnostic tool in rectal carcinomas, since this tumor doesn't have a specific and sensitive diagnostic marker.

50 rectal carcinomas at the different stage were monitored in pre-treatment conditions by CEA, CA19-9, TPA and TPS RIA assays (ADALTIS Italy, ABBOTT Diagn. Div. Japan, IDL Biotech Sweden respectively). 25 patients belonged to T1N0M0, 15 T2N0M0 and T3N1M0. The data were expressed as mean \pm standard deviation and processed by Student test (* p < 0.05, ** p < 0.01).

PATIENTS CEA ng/ml CA19-9 U/ml TPA monototal U/l TPS U/l

20 Disease-free 1.8 \pm 1.4 13.4 \pm 6.8 50.2 \pm 18 48 \pm 15.3
25 T1N0M0 2.7 \pm 1.6 12.1 \pm 8.9 85.4 \pm 60.4* 71.3 \pm 23.9 *

15 T2N0M0 5.2 \pm 3 * 9.3 \pm 11.6 118.3 \pm 47 ** 92.3 \pm 39.4 **

10 T3N1M0 10.8 \pm 4.2 ** 21.5 \pm 7.7 156 \pm 47.8 ** 127.1 \pm 65 **

The results showed that CEA and CA19-9 were helpless for primitive diagnosis of rectal cancer. The mean values of TPA and TPS were above of our cut-off (75 U/l and 70 U/l respectively) in all patients studied, even in those belonged T1N0M0.

In this context, in absence of specific marker, serum cytokeratin markers (TPA monototal, TPS) could result superior to the more commonly used CEA, above all in the early detection of rectal cancer.

158

INDEPENDENT PROGNOSTIC VALUE OF PRESURGICAL SERUM LEPTIN LEVELS IN METASTATIC COLORECTAL CANCER PATIENTS

R. D'Alessandro¹, P. Ferroni¹, R. Palmirotta¹, F. Martini¹, A. Savonarola¹, I. Lucci¹, S. D'Angelo¹, L. Polce¹, M. Ciancia¹, B. Leone¹, M. Roselli², F. Guadagni¹

¹Dept. of Laboratory Medicine & Advanced Biotechnologies, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy

²Medical Oncology, Department of Internal Medicine, University of Rome "Tor Vergata", Policlinico Tor Vergata, Rome, Italy

Recent studies have indicated that leptin may act as a potent mitogen and anti-apoptotic cytokine in colorectal cancer. Epidemiological studies have suggested that leptin is correlated with the risk of colorectal cancer (CRC) associated with obesity, but the clinical significance of such association is largely unknown. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible associations between leptin and clinicopathological variables of CRC and to analyze its possible prognostic value in predicting relapse-free and overall survival.

Baseline leptin levels were analyzed in 90 patients (49 males, 41 females; mean age 63 \pm 11 years) with histologically diagnosed primary (Stages A: 7, B: 34, C: 19 and D: 13, with a single resectable liver metastasis) or metastatic (liver: 8, peritoneum: 5, lung: 1 and multiple: 3) CRC treated at "Tor Vergata" Clinical Center and followed for a median period of 3 years. As control group, in a 3:1 ratio, 30 control subjects (13 males, 17 females; mean age 59 \pm 12 years) were also evaluated.

Median serum leptin levels were higher in CRC patients (8.8 ng/ml) than control subjects (1.1 ng/ml, p < 0.0001). Of interest, median leptin levels of newly diagnosed metastatic CRC (10.9 ng/ml) were higher than those observed in primary CRC patients (7.7 ng/ml, p = 0.034), including Stage D CRC (3.9 ng/ml, p < 0.01). Forty-seven percent of non metastatic CRC had leptin levels above an arbitrary cut-off of 8.18 ng/ml (95th percentile of controls) compared with 71% of metastatic patients (p = 0.07). Overall survival time of metastatic patients with leptin levels below the cut-off was longer (21.7 months) than that of patients with leptin levels above the cut-off (12.6 months, p = 0.07). Cox proportional hazard regression model showed that leptin was an independent predictor for overall survival in metastatic CRC (Cox-Mantel test 2.03, p = 0.042).

Based on these results, we may conclude that leptin might have a role in the biology of CRC and that the determination of serum adiponectin levels might represent a useful prognostic parameter in the management of patients with metastatic CRC.

References

Slattery ML and Wolff RK. Leptin and colorectal cancer: an undefined link. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2007;4:118-9.

159

PAI-1, TPA AND CIRCULATING HTERT DNA RELATED TO VIRUS INFECTION IN LIVER CARCINOGENESIS

R. Divella¹, S. Tommasi¹, R. Lacalamita¹, M. Coviello¹, A. Daniele¹, B. Lanzillotta¹, M. Quaranta¹, A. Zito¹, G. Simone¹, A. Paradiso¹

¹Clinical Experimental Oncology Laboratory, National Cancer Institute "Giovanni Paolo II", Bari, Italy

Aim. Liver carcinogenesis seem to be heavily influenced by virus infection. Aim of our study was to improve the detection of HCC by measuring AFP in addition to other molecular markers involved in the process of cancer invasion and metastasis estimating the plasma levels of circulating hTERT DNA, PAI-1 and tPA in peripheral blood of HCC patients. Were enrolled 75 patients (pts) (age 45 to 87 years): 54 HCC (hepatocellular carcinoma), 16 LM (liver metastasis), 5 chronic liver disease (HCV+). A control group (N=30) has been enrolled among healthy people.

Methodology. PAI-1 and tPA plasma levels were detected with ELISA assay. DNA was extracted from plasma using commercial kits based on affinity columns. The quantitation of hTERT was performed with RealTime PCR and data were analysed by SPSS software.

Results. PAI-1 and tPA plasma levels were significantly elevated in HCC pts when compared with that of controls: 40.11±26.56 ng/ml vs 5.75±0.98 ng/ml for PAI-1 and 37.04±30.27 ng/ml vs 4.2±9 ng/ml for tPA, respectively. Circulating hTERT DNA levels was higher in pts (2.26±7.44 ng/ml) than in control subjects (0.03±0.09 ng/ml). Both PAI-1 and tPA levels were higher in the presence of both viruses with respect to their absence: 60.34±26.9 ng/ml in HCV+/HBV+ pts vs 28.12±13.13 ng/ml in HCV-/HBV- pts (p<0.001) for PAI-1 and 58.64±32.55 ng/ml in HCV+/HBV+ vs 28.13±19.9 ng/ml in uninfected patients (p<0.001) for tPA. Also hTERT resulted significantly higher in presence of both virus, p<0.05 and in presence of only HCV, p<0.05. Also the percentage of HCC pts with high tPA, PAI-1 and hTERT resulted increased in virus infected pts, p=0.001. High hTERT levels were associate with poor differentiated tumors, in particular when viruses are present (p=0.02). No decreasing or increasing levels of AFP was noted in these pts.

Conclusion. Our data suggested that AFP, usually used as marker in HCC prognosis failed its role in presence of HBV and/or HCV. Our data suggested the releability of PAI-1, tPA and hTERT in detecting HCC in particular when the carcinogenesis is affected by virus infection.

Reference

S. Tommasi, R. Pinto, B. Pilato and A. Paradiso. Molecular pathways and related target therapies in liver carcinoma. *Current Pharm Des*, 2007. Vol(13); in press.

160

HELICOBACTER PYLORI CAGA AND VACA POLYMORPHISMS DIFFERENTLY EFFECT THE ROLE OF PEPTIC ULCER AND GASTRIC CANCER

S. Schiavon¹, C. Zambon², A. Stranges¹, D. Basso¹, D. P. Letley³, A. Marchet⁴, J. L. Rhead³, G. Guariso⁵, M. Ceroti⁶, D. Nitti⁴, M. Rugge⁴, M. Plebani¹, J. C. Atherton³

¹Dept. of Laboratory Medicine, University of Padova, Italy

²Dept. Medical&Surgical Sc., Univ. Padova, Italy

³Wolfson Digestive Diseases Centre, and Inst. of Infection, Immunity and Inflammation, Univ. of Nottingham, Queen's Medical Centre, Nottingham, UK

⁴Dept. Oncological&Surgical Sc., Univ. Padova, Italy

⁵Dept. of Paediatrics, Univ. of Padova, Italy

⁶Molecular and Nutritional Epidemiology Unit, CSPO-Scientific Inst. of Tuscany, Florence, Italy

H.pylori vacA s and m alleles and the cagA gene enhance peptic ulcer (PU) and gastric cancer (GC) risk. Our aim was to ascertain whether variations in the vacA intermediate region (i) and different number of CagA phosphorylation sites (EPIYA-C) might differently effect the role of PU or GC. We studied 203 patients with H.pylori-associated GC (n=53), PU (n=52) or non atrophic gastritis (NAG n=98). Biopsy (benign diseases) or surgical samples (gastric cancer) were taken for histology and for H.pylori diagnosis (histology and/or culture and/or PCR). DNA from frozen samples (GC) and from clinical H.pylori isolates (PU and NAG) was used to PCR analyse s, i and m vacA alleles and cagA gene. The 3'region of cagA including the EPIYA motifs, was PCR analysed in 59 patients with benign diseases and in 47 with GC and sequenced in a subset of 28 samples (14 GC, 6 PU, 9 NAG). 149/203 patients were cagA positive. cagA correlated with s1 (p<0.0001), i1 (p<0.0001) and m1 vacA (p<0.0001). EPIYA-C repeats ranged from 0 to 3. On the basis of EPIYA-C results single and multiple infections were identified: 44 single, 15 multiple among benign diseases, 28 single and 19 multiple among GC. 2 groups were identified: Group1: infections with no more than one EPIYA-C (60 cases); Group 2: infections with a maximum of 2 (40 cases) or 3 (7 cases) EPIYA-C. At the univariate multinomial logistic analysis, s, i vacA alleles and cagA enhanced GC risk (OR=7.73; 95% CI=2.58-23.22; OR=5.08; 95% CI=2.15-11.97; OR=11.02; 95% CI=3.21-37.81). I vacA enhanced PU risk (OR=2.55; 95% CI=1.20-5.39). Group 1 and 2 EPIYA-C enhanced GC, not PU, risk (OR=5.29, 95% CI=1.89-14.83 and OR=23.33, 95% CI=7.96-68.41). The conditional multivariate logistic model, including terms for age and sex, confirmed i1 vacA as a PU risk (OR=2.73, 95% CI=1.21-6.16) and group 1 and 2 EPIYA-C as GC risk factors (OR=5.73; 95% CI=1.54-21.34 and OR=25.84; 95% CI=5.57-119.83). In conclusion: genetic polymorphisms in the 3'region of cagA and in intermediate region of vacA evoke different disease outcomes in cagA positive infected subjects: an increased number of EPIYA-C motifs enhance GC not PU, while i1 vacA allele seems to predispose mainly to peptic mucosal ulceration.

161

PLASMA LOW MOLECULAR WEIGHT THIOLS REDOX STATUS EVALUATION AFTER AN ACUTE PHYSICAL EXERCISEC. Carru¹, A. Zinellu¹, S. Sotgia¹, B. Scanu¹, M. Sanna¹, R. Rossi¹, L. Musino¹, S. Pettinato², R. Ginanneschi², L. Deiana¹¹*Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari*²*Laboratorio di Medicina di Base ASL N°1 di Sassari*

Reactive oxygen species (ROS) are formed during normal physiologic processes by non-enzymatic and enzymatic sources. Thus, an intense aerobic physical exercise results in an oxidative stress, which is associated with increases in lipid peroxidation and protein oxidation. In general, the body has adequate antioxidant reserves to cope with the ROS production under physiological conditions. The system consists of antioxidant vitamins, glutathione and other thiols, and antioxidant enzymes. To evaluate the levels of reduced and total low molecular weight (LMW) plasma thiols (cysteinylglycine, homocysteine, cysteine, glutathione and glutamylcysteine) before and after a single bout physical exercise we selected 16 subjects (6 sedentaries and 10 athletes) that had been submitted to incremental cycle ergometer stress test. Plasma for analysis was taken before and immediately after the exercise. Capillary electrophoresis analysis showed no difference in total LMW thiols between pre and post exercise both in athletes and sedentaries. Nevertheless, homocysteine and cysteine were lower in athletes than in sedentaries in both pre and post physical activity while CysGly and GSH were significantly decreased only after exercise. After physical activity, reduced Hcy concentration was decreased of about 11 % in sedentaries and 12% in athletes. Moreover, athletes had significant lower levels of Hcy and GSH if compared with sedentaries in both pre and post exercise tests. Reduced cysteine levels were lower in athletes but the difference was not statistically significant. The redox state of each thiol shows that the only alteration after the physical activity was in the homocysteine values that were significantly decreased ($3.24 \pm 0.74\%$ vs $2.91 \pm 0.81\%$, $p=0.009$, in sedentaries; $3.41 \pm 0.86\%$ vs $2.97 \pm 0.93\%$, $p=0.004$ in athletes). In conclusion our data suggest that a single bout of physical activity is not sufficient to produce as much ROS level as necessary to imbalance the redox status of LMW plasma thiols. Moreover, a regular physical activity may have beneficial effects by decreasing the total plasma homocysteine, a well known risk factor for cardiovascular disease, and cysteine, an emerging risk factor for cardiovascular disease.

162

STUDIO DEGLI EFFETTI DELL'IMMERSIONE IN GHIACCIO SULL'EMOLISI DA SPORT IN GIOCATORI DI RUGBYG. Banfi¹, M. Patacchini², A. Patricola¹, P. Allori³, N. Di Gaetano⁴¹*IRCCS Istituto Galeazzi, Milano*²*Federazione Italiana Rugby*³*Ospedale Regionale Valle d'Aosta*⁴*Istrumentation Laboratory, Milano*

Il gioco del Rugby provoca stress muscolare e fenomeni di emolisi intravascolare. Si è studiato l'effetto dell'immersione degli arti inferiori in acqua fredda sul recupero muscolare dopo allenamento, valutando i parametri CBC/Diff/Ret, in particolare MSCV (vol. medio cell. sfericizzate). Abbiamo prelevato 30 atleti della nazionale di rugby prima(T0), dopo l'allenamento(T1) e dopo il defaticamento(T2) in 3 gruppi random: il gruppo NU ha riposato, BG ha fatto 10m di bici + 10m di immersione, e GB ha fatto il contrario. L'analisi è stata fatta su Coulter LH750, dotato di tecnologia AccuCount e VCS per conteggi, analisi leucocitaria e reticolocitaria con Nuovo Blu di Metilene dopo sfericizzazione.

I dati ottenuti evidenziano uno stato simil-infiammatorio con aumento di WBC e NE. Non vi sono variazioni significative tra gruppi, anche se BG e GB hanno differenze T2-T1 minori rispetto a NU. I dati di MCV Hb Ht RBC e MSCV dell'intero team a T0/T1/T2 sono simili. Le differenze MCV-MSCV sono diverse in T1 e T2 (1,09 e 2,82 $p<0.05$) specie per NU (0,30 e 2,96 $p<0.05$). Ciò indica probabile stress eritrocitario e emolisi da sforzo. In BG e GB la differenza non è significativa, indice che forse l'immersione ha attenuato lo stress di membrana e l'emolisi intravascolare. I valori in BG a T1/T2 sono 1,44 e 2,86 ($p=ns$) e per GB sono 0,72 e 2,69 ($p=ns$).

La valutazione degli atleti deve discriminare le variazioni fisiologiche da quelle dovute all'attività sportiva specie se sono patologiche. L'attività intensa comporta stress muscolare con la produzione di tossine che inducono infiammazione ed emolisi. Abbiamo studiato l'utilità dell'immersione in ghiaccio nel contrastare questi effetti. I dati confermano che l'attività agonistica aumenta WBC e NE e che l'immersione agevola il recupero. La differenza MCV-MSCV, che può indicare patologie di membrana, è significativa tra T1 e T2 solo nel gruppo NU inducendoci a pensare che il danno dei RBC da parte di radicali liberi e stress osmotico, venga attenuato dall'immersione a freddo. Si conferma l'utilità di MSCV per segnalare emolisi negli atleti.

Bibliografia

1. Chiron M, Hemathol Cell Ther 1999;41:113
2. Banfi G, et al, Br J Sports Med 2007;41:339

163

VARIATION OF RETICULOCYTES COUNT AND IMMATURE FRACTIONS FOLLOWING A HALF-MARATHON RACE

G. Lippi¹, F. Schena², M. Montagnana¹, G. L. Salvagno¹, C. Tarperi², M. Gelati¹, G. Banfi³, G. C. Guidi¹

¹Sez. Chimica Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona

²Sez. Scienze Motorie, Dip. Scienze Neurologiche e della Visione, Università di Verona

³Ist. Galeazzi e Università di Milano

Strenuous physical exercise exerts a strong influence on the haematological profile due to intravascular haemolysis, to mechanical trauma, high body temperature, dehydration, haemoconcentration and oxidative stress. Although some of these changes have been acknowledged in some sports, few data are available on runners undergoing a half-marathon race. Therefore, red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, reticulocytes count and immature fractions were evaluated in 15 endurance-trained subelite athletes performing regular training session at least 4 times a week, before a 90 min half-marathon, at the end of the race, 3 hours, 6 hours and 24 hours thereafter. The haematological parameters were tested on the Advia 120 hematologic analyzer. Significant differences by one-way analysis of variance (\pm) were detected for red blood cell count, hematocrit and hemoglobin, whereas no significant variation was detected for either the reticulocytes count and the immature fractions. When compared to the pre-marathon values, red blood cell count, hematocrit, hemoglobin and the M-RTC fraction were significantly different (\dagger by Wilcoxon paired signed ranked test) at the end of the marathon, whereas significant differences at 24 hours were recorded for red blood cell count, hematocrit, hemoglobin, reticulocytes count and the H-RTC fraction. We conclude that a 90 min half-marathon produces transitory changes in the routine haematological profile, but not in the reticulocytes count and immature fractions.

	Sampling time				
	Pre	Post	3h	6h	24h
RBC, 10 ⁶ μ L	4.8 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2 \dagger	4.9 \pm 0.2 \dagger	4.8 \pm 0.3	4.7 \pm 0.2 \dagger
Ht, %	44.9 \pm 2.2	46.6 \pm 2.0 \dagger	45.1 \pm 2.7 \dagger	44.3 \pm 2.7	43.7 \pm 2.5 \dagger
Hb, g/dL	15.2 \pm 0.9	15.9 \pm 0.8 \dagger	15.3 \pm 1.0 \dagger	15.0 \pm 1.0	14.8 \pm 0.9 \dagger
RTC, 10 ⁹ L	56.2 \pm 10.4	54.3 \pm 12.7	53.3 \pm 11.7	52.4 \pm 10.3 \dagger	51.4 \pm 10.5 \dagger
L-RTC	1.6 \pm 1.0	1.5 \pm 0.9	1.8 \pm 1.5	1.2 \pm 0.6 \dagger	1.5 \pm 1.2
M-RTC	8.3 \pm 3.3	7.1 \pm 3.6 \dagger	7.6 \pm 3.0	7.4 \pm 2.8	7.6 \pm 3.1
H-RTC	4.63 \pm 7.0	4.56 \pm 9.0	4.38 \pm 7.8	4.37 \pm 7.3 \dagger	4.33 \pm 6.7 \dagger

164

VARIATION OF ROUTINE HAEMATOLOGICAL PARAMETERS FOLLOWING A HALF-MARATHON RACE

G. Lippi¹, F. Schena², G. L. Salvagno¹, M. Montagnana¹, C. Tarperi², M. Gelati¹, G. Banfi³, G. C. Guidi¹

¹Sez. Chimica Clinica, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona

²Sez. Scienze Motorie, Dip. Scienze Neurologiche e della Visione, Università di Verona

³Ist. Galeazzi e Università di Milano

A frequently underestimated aspect within antidoping testing is the strong influence of strenuous physical exercise on the haematological profile. These erythropoietic changes may be due to several mechanisms such as intravascular haemolysis due to mechanical trauma, high body temperature, dehydration, haemoconcentration and oxidative stress. Although some of these changes have been describe in different sports, few data are available on runners undergoing a half-marathon race. Therefore, routine haematological parameters were evaluated in 15 endurance-trained subelite athletes performing regular training session at least 4 times a week, before a 90 min half-marathon, at the end of the race, 3 hours, 6 hours and 24 hours thereafter. Routine haematological parameters were tested on the Advia 120 hematologic analyzer. Significant differences by one-way analysis of variance (\pm) were detected for RBC count, hematocrit, hemoglobin, platelets count, white blood cells counts, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils. When compared to the pre-marathon values, all the parameters tested but the main platelet volume were significantly different (\dagger by Wilcoxon paired signed ranked test) at the end of the marathon, whereas significant differences at 24 hours were only recorded for red blood cell count, hematocrit and hemoglobin. We conclude that a 90 min half-marathon produces transitory but remarkable changes in the routine haematological profile. Such changes should be accurately taken into consideration when testing the athletes for both clinical and antidoping purposes.

	Sampling time				
	Pre	Post	3h	6h	24h
RBC, 10 ⁶ μ L	4.8 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2 \dagger	4.9 \pm 0.2 \dagger	4.8 \pm 0.3	4.7 \pm 0.2 \dagger
Ht, %	44.9 \pm 2.2	46.6 \pm 2.0 \dagger	45.1 \pm 2.7 \dagger	44.3 \pm 2.7	43.7 \pm 2.5 \dagger
Hb, g/dL	15.2 \pm 0.9	15.9 \pm 0.8 \dagger	15.3 \pm 1.0 \dagger	15.0 \pm 1.0	14.8 \pm 0.9 \dagger
MCV, fL	92.8 \pm 3.3	91.2 \pm 3.0 \dagger	91.5 \pm 3.5 \dagger	91.8 \pm 3.2 \dagger	92.3 \pm 3.6
MHC, pg	314 \pm 12	311 \pm 12 \dagger	310 \pm 12 \dagger	311 \pm 12 \dagger	313 \pm 13
PLT, 10 ⁹ μ L	228 \pm 68	234 \pm 54 \dagger	227 \pm 46	231 \pm 53	221 \pm 57 \dagger
MPV, fL	8.7 \pm 1.0	8.9 \pm 0.8	8.7 \pm 0.8	8.5 \pm 1.0	8.8 \pm 0.7
WBC, 10 ⁹ μ L	5.7 \pm 1.1	10.1 \pm 2.6 \dagger	11.8 \pm 2.4 \dagger	9.9 \pm 1.6 \dagger	5.6 \pm 0.8 \dagger
Neutrophils	3.12 \pm 0.77	7.16 \pm 2.58 \dagger	9.38 \pm 2.32 \dagger	7.21 \pm 1.55 \dagger	3.01 \pm 1.64 \dagger
Lymphocytes	1.93 \pm 0.42	2.22 \pm 0.55 \dagger	1.90 \pm 0.38 \dagger	1.99 \pm 0.32	1.97 \pm 0.39 \dagger
Monocytes	0.32 \pm 0.07	0.44 \pm 0.12 \dagger	0.47 \pm 0.14 \dagger	0.44 \pm 0.08 \dagger	0.33 \pm 0.06 \dagger
Eosinophils	0.16 \pm 0.07	0.10 \pm 0.05 \dagger	0.03 \pm 0.02 \dagger	0.07 \pm 0.03 \dagger	0.16 \pm 0.05 \dagger
Basophiles	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.04 \dagger	0.07 \pm 0.04 \dagger	0.06 \pm 0.04 \dagger	0.04 \pm 0.01 \dagger
LUC	0.11 \pm 0.02	0.12 \pm 0.05 \dagger	0.12 \pm 0.03 \dagger	0.13 \pm 0.03 \dagger	0.12 \pm 0.03

165

ANEMIA AND IRON DEFICIT IN NON PROFESSIONAL FEMALE ATHLETESM. Di Santolo¹, G. Stel², F. Gonano², S. Cauci¹¹*Department of Biomedical Sciences and Technologies, School of Medicine, University of Udine, Italy; *Gruppo di Studio Medicina di Laboratorio dello Sport*²*Department of Experimental and Clinical Pathology and Medicine, School of Medicine, University of Udine, Italy*

Purpose. We aimed to evaluate the effects of regular physical exercise on anemia and iron deficit in young fertile non professional female athletes.

Methods. A total of 150 healthy menstruating white Italian women, mean age 24 years, were analyzed; of these, 50 women were no elite athletes performing >10 hours exercise/week and 100 women were sedentary controls. Blood markers of anemia and iron status – hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), red blood cells (RBC), serum ferritin, iron, transferrin (Tf), transferrin saturation (TfS), serum soluble transferrin receptor (sTfR), and the sTfR/log ferritin ratio (sTfR-F index) were evaluated. Serum ferritin concentrations <12 µg/L were considered as iron deficit; anemia threshold was Hb <120 g/L.

Results. Anemia (p=1.00) and iron deficit (p=0.89) frequencies were not different between athletes and controls. However, sport activity markedly reduced serum iron; iron concentrations <60 µg/dL were 2-fold more frequent in athletes than in controls (p=0.02). In addition, athletes compared with non athletes had a significant elevation of sTfR; levels of sTfR >1.76 mg/L were found 2-fold more frequently in athletes than in controls (p=0.06). Of note, haptoglobin concentrations were decreased in athletes compared to controls (p=0.02).

Conclusion. Regular non professional sport activity does not cause an increased rate of anemia or frequency of low iron stores in young fertile women. However, physical exercise reduces serum iron. Notably, a level of regular exercise >10 h/week increases the frequency of iron deficient erythropoiesis as evaluated by elevation of sTfR.

166

SERUM OXIDATIVE STATUS PRE- AND POST-RACE IN TRIATHLETESM. Di Santolo¹, C. Capelli², S. Cauci¹¹*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Udine; Corso di Laurea in Scienze Motorie, Gemona, Udine, Università di Udine, Udine; e Gruppo di Studio Medicina di Laboratorio dello Sport della SIBIOCI*²*Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Facoltà di Scienze Motorie, Università di Verona, Verona*

Objective. It is known that strenuous physical exercise can cause oxidative stress, both by increasing reactive oxygen species (ROS) and by reducing the activity of the antioxidant system. Consequently, oxidative stress can have negative effects on the athletic performance because it can cause muscular fatigue during contraction and muscular damage and suffering in post-exercise. The aim of this study was to evaluate serum oxidative status in triathletes in a rested state and post-prolonged strenuous exercise.

Methods. To study the effects of oxidative stress during strenuous exercise we enrolled a homogeneous group of eleven experienced male triathletes (age 34 ± 6.3 years) that participated in a sprint triathlon race (750 m swim, 20 km cycle, and 5 km run). Blood samples were collected for evaluate serum ROS (mainly hydroperoxides) levels at rest, immediately after race and 24 h post-race.

Results. We found that mean ROS concentrations increased 1.4-fold at 24 h after the race compared with the levels found in rested state (P=0.006). On the contrary, no significant changes in oxidative status was observed immediately after race (P=0.261) in respect to baseline levels.

Conclusion. This study supports the hypothesis that strenuous exercise leads to increased oxidative stress not soon but one day after race.

Reference

Finaund J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006;36:327-358.

167

INFLAMMATORY CYTOKINES AND OXIDATIVE STRESS: PARAMETERS TO EVALUATE THE PHYSICAL STATUS DURING SPORT ACTIVITYR. Zenobi¹, R. Verna², M. G. Giganti³¹Department of Internal medicine University of Rome "Tor Vergata"²CRISC, Center for Clinical research, University of Rome "La Sapienza"³Department of Experimental medicine, University of Rome "Tor Vergata"

The development of Sport Medicine in the knowledge of the metabolic and biochemical aspects of athletes has impressively grown during the last ten years; in this perspective, a pivotal role has been played by the knowledge of the inflammatory status. In this study we have investigated the modification of inflammatory cytokines and free radicals in two different groups of subjects: 40 amateurs athletes and 19 sedentary controls. Athletes have a regular exercise (three times at week) and do aerobics and anaerobics sports. Controls have a sedentary lifestyle and do not practice any physical exercise. All were healthy; neither family or personal history of diabetes, nor thyroid, hepatic and renal dysfunction was reported. Both groups were similar in age. We have studied the plasma modifications of Interleukin 6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and the Reactive Oxygen Metabolites (ROM).

10 ml blood samples were obtained from the antecubital vein early in the morning and after centrifugation (800gx5min.), the supernatants were stored at -20°C until the assays.

Cytokines were measured with a commercially available ELISA kit (RD system, Minneapolis USA) and plasma ROMs (mainly hydroperoxides) by the d-ROM test (Diacron International s.r.l., Grosseto, Italy)

Data have been compared by the unpaired t test or one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

No statistically significant difference between athletes and controls was detected in the plasma level of IL-6, TNF- α and ROMs:

amateurs IL-6 mean 5.28(SD 3.64), TNF- α mean 10.2 (SD 5.12) ROMs mean 309.01(SD 54.87); controls IL-6 mean 3.90(SD 2.03), TNF- α mean 11.96 (SD 4.56) ROMs mean 277.06(SD 63.06).

The results suggest that sport activity itself is not responsible of inflammatory events and that there are not contraindications for controlled physical exercise either in men or in women, at any age.

In the next future we would like to analyze the possible modifications of the same parameters in the top level athletes with the aim to observe if a greater frequency of training causes modifications of inflammatory parameters.

References

1. M. Gleeson. Immune function in sport and exercise. *J Appl. Physiol.* 2007 Feb 15

168

VALUTAZIONE DI PARAMETRI RETICOCITARI ED ERITROCITARI IN UNA COORTE DI ATLETIR. A. Salvo¹, P. Diana¹, G. D'Amico¹, A. Mastrone¹¹Area Chimico-Clinica, Centro Regionale Antidoping "A. Bertinaria", Orbassano, Torino

L'esame emocromocitometrico, riveste un ruolo di primaria importanza non solo nella definizione dello stato di salute degli atleti ma anche come parametro indiretto di assunzione di sostanze dopanti volte ad aumentare il potenziale aerobico. La disponibilità di nuovi parametri analizzabili con sistemi automatici arricchisce le potenzialità del laboratorio di ematologia. In letteratura esistono pochi studi mirati alla definizione di range di riferimento per gli sportivi. Scopo del nostro studio è stato analizzare su 325 atleti di sport invernali, durante la stagione agonistica, i seguenti parametri eritrocitari e reticolocitari: MCV e MCVr (Volume Corpuscolare Medio eritrocitario e reticolocitario), MCH e CHr (Contenuto Emoglobinico Medio eritrocitario e reticolocitario), CHCM e CHCMr. (Concentrazione Emoglobinica Media eritrocitaria e reticolocitaria). I risultati dello studio condotto presso il nostro laboratorio sono:

MCV: Per valori < 80.0 fL la % degli Atleti (A) era 1.8. Per valori compresi fra 80.1-84.0 fL la % degli A era 24.3. Nell'intervallo 84.1-88.0 fL la % degli A era 50.7. Nel range 88.1-92.0 fL la % degli A era 19.7. Per valori >92.1 fL, la % degli A era 3.4.

MCVr: Per valori < 101 fL la % degli A era 3.7 Nel range 101.1-105 fL la % degli A era 31.7. Nell'intervallo 105.1-109 fL la % degli A era 53.2 Nel range 109.1-111 fL degli A era 7.7. Per valori >111.1 fL la % degli A era 3.7.

MCH: Per valori <30.0 pg la % degli A era 16.9. Per valori compresi fra 30.1-31 pg la % degli A era 33.2. Nell'intervallo 31.1-32 pg la % degli A era 30.2. Per valori >32.1 pg la % degli A era 19.7.

CHr: Per valori <32.0 pg la % degli A era 8.3. Per valori compresi fra 32.1-33 pg la % degli A era 19.1. Nell'intervallo 33.1-34 pg la % degli A era 34.8. Nel range 34.1-35 pg la % degli A era 27. Per valori >35.1 pg la % degli A era 10.8.

CHCM: Per valori <35.0 pg la % degli A era 12.9. Per valori compresi fra 35.1-36 pg la % degli A era 38.8. Nell'intervallo 36.1-37 pg la % degli A era 28.9. Per valori >37.1 pg la % degli A era 19.4.

CHCMr: Per valori <31.0 pg la % degli A era 19.4. Per valori compresi fra 31.1-32 pg la % degli A era 42.5. Nell'intervallo 32.1-33 pg la % degli A era 28.0. Per valori >33.1 pg la % degli A era 10.2.

169

IS CREATINE THE "MISSING LINK" TO UNDERSTAND THE RELATIONSHIP BETWEEN PLASMA HOMOCYSTEINE LEVEL AND PHYSICAL ACTIVITY?

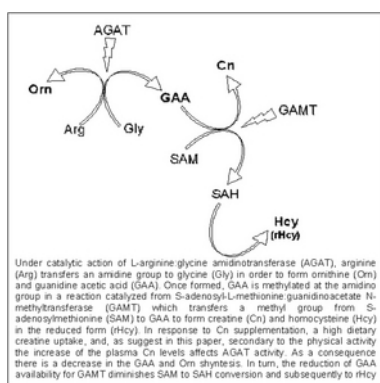
S. Sotgia¹, A. Zinellu¹, B. Scanu¹, E. Pisanu¹, L. Deiana¹, C. Carru¹

¹Chair of Clinical Biochemistry Dept. of Biomedical Sciences, University of Sassari

Recently we observed that in a group of volunteers after a single bout of exercise a significant increase of plasma creatine (Cn) concentrations occurs. From additional studies on the same group subjected to the same exercise, we also observed that the proposed physical activity was unable to influence total homocysteine (Hcy) concentrations but, interestingly, it produced a significant decrease of reduced homocysteine (rHcy) plasma concentrations [1]. Starting from these findings, in this study we investigated whether the modification in Hcy level after a moderate physical activity was explainable in the light of the common connection of physical activity and homocysteine to creatine. The feedback action exerted by the increased creatine on AGAT, which is the first and rate-limiting step in creatine biosynthesis, would provide the mechanistic base for this connection as shown below. By measuring the levels of some valuable pointers of the state of creatine synthesis process, especially guanidine acetic acid (GAA), we have found several elements that support this suggestion. In fact, as expected in a context determined by the inhibition of creatine biosynthesis, in the post exercise phase guanidine acetic acid decreases significantly. This result strengthens the idea that after exercise reduced Hcy diminishes as a result of the inhibition of creatine biosynthesis induced by the increase of its circulating levels due to the physical exercise.

References

1. Zinellu A, Sotgia S, Caria MA, et al. Effect of acute exercise on low molecular weight thiols in plasma. *Scand J Med Sci Sports*. 2006; published online Feb 14. doi:10.1111/j.1600-0838.2006.00542.x



170

DIAGNOSTIC PERFORMANCE OF AN IMPROVED CYTOCHEMICAL ASSAY (MTT/FORMAZAN) IN DETECTING HETEROZIGOUS G6PD DEFICIENCY

C. Ialongo², J. Alessandrone¹, R. Colletti¹, I. Antonozzi², P. Ialongo¹

¹Dip. Medicina Sperimentale, I Facoltà di Medicina Università "La Sapienza"

²Cattedra Patologia Clinica I, Dipartimento Medicina Sperimentale, I Facoltà di Medicina Università "La Sapienza"

Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency is a X-linked recessive disease characterized by non-spherocytic hemolytic anemia as response to different causes involving red blood cells oxidative stress. Deficient females, who show mosaicism in their red blood cells population regarding to G6PD activity, are usually not properly detected by both semi-quantitative and spectrophotometric methods. This situation is further embroiled by reticulocytosis, a physiological response to deficient erythrocytes that rises levels of total G6PD in blood, and by a high number of possible gene mutations (more than 300), affecting with different weight the enzymatic activity.

Objectives. To determine if qualitative test ^{1,2} (an improved cytochemical test utilizing MTT/Formazan reduction reaction in isolated erythrocytes) is more reliable than the quantitative one (spectrophotometry), in recognizing heterozygous G6PD-deficient subjects. Design and methods. 48 heterozygous G6PD-deficient subjects together with a non deficient females (262 blood donors) determined by both spectrophotometric and cytochemical test in a double-blind experimental design. Results. The cytochemical test (MTT/Formazan) has been proved to be more sensitive (98% vs 79%) and equal specific (96% vs 97%) regarding to spectrophotometric in identifying heterozygous G6PD-deficient subjects.

References

1. Pujades A, Lewis M, Salvati AM, Miwa S, Fujii H, Zarza R, Alvarez R, Rull E, Corrons JL "Evaluation of the blue formazan spot test for screening glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency", *Int J Hematol*. 1999 Jun;69(4):234-6
2. Fairbanks VF, Lampe LT "A Tetrazolium-Linked Cytochemical Method for Estimation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity in Individual Erythrocytes: Applications in the Study of Heterozygotes for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency", *Blood* 1968, Vol. 31, No. 5, pp.589-603

171

REPLACING PANCREATIC AMYLASE WITH LIPASE IN THE EMERGENCY DEPARTMENT EVALUATION OF PATIENTS WITH SUSPECTED ACUTE PANCREATITIS: A SIX-MONTH EXPERIENCE

C. Valente¹, R. Dominici¹, M. Panteghini¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera L. Sacco, e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano

Background. Laboratories measuring lipase often offer this test in addition to total and/or pancreatic amylase (P-AMY). However, biochemical and pathophysiological evidences show that obtaining of both AMY and lipase for diagnosis of acute pancreatitis represents an unwarranted duplication (1). As lipase is superior to total/P-AMY in terms of diagnostic performance, lipase should replace AMY as initial test for pancreatitis.

Methods. We eliminated the P-AMY measurement from the list of emergency tests keeping only lipase available, and evaluated the effectiveness of the change on test utilization by comparing two 6-month periods, one before (S1) and one after (S2) the change institution.

Results. Total test requests were halved after the change implementation (from 16,760 in S1 to 8,389 in S2). The dramatic decrease of P-AMY (11,791/S1 to 177/S2) was only partly compensated by the increase in lipase requests (4,969/S1 to 8,212/S2). As no change occurred in numbers of patients admitted with suspected pancreatitis in the two evaluated periods, the decrease in test number only reflected the change in the biomarker availability in Emergency Department setting. Unlike P-AMY often used as a screening test in unselected populations, the use of lipase appears to be correctly restricted to a symptomatic population with suspected pancreatitis. Owing to the test reduction and difference in cost (€ 0.60 for lipase vs. € 0.97 for P-AMY), testing costs was reduced by € 9,319 per half-year.

Conclusions. P-AMY replacement with lipase as emergency test for suspected pancreatitis is not only recommended to improve diagnostic performance, but also to reduce test overutilization and inappropriate requests.

References

1. Vissers RJ, Abu-Laban RB, McHugh DF. Amylase and lipase in the emergency department evaluation of acute pancreatitis. *J Emerg Med* 1999;17:1027-37.

172

SERUM FREE LIGHT CHAIN ASSAY: METHOD DEPENDENT?

D. Ricotta¹, A. Radeghieri¹, L. Caimi¹

¹Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina, Brescia

Quantification of serum-free immunoglobulin light chain levels (FLC assay) and kappa/lambda ratio can be used as an alternative to quantifying urinary light chains (Bradwell et al, 2003). This work aims to define the ability of different methods to assess the serum concentration of free light chains and the correlation of such determinations with the clinical diagnosis of some patients.

Patient and Methods. Serum from: 8 patients suffering of renal failure of ndd with or without a monoclonal component of uncertain significance at the serum protein electrophoresis, 7 patients with the diagnostic evidence of Amyloidosis, 7 patients with lymphoproliferative disease (Multiple Myeloma, Micro molecular Myeloma, Solitary Plasmacytoma) and 2 patients with a double monoclonal component at the serum protein electrophoresis were collected and tested. Samples were processed for immunofixation, FLCs quantification and serum protein electrophoresis. Nefelometric assays for serum FLC were performed on an Delta analyzer (RADIM), using Freelite Reagent Sets (The Binding Site Ltd, Birmingham, U. K.) or on an BNII nephelometer (Dade Behring) using New Scientific Company reagent sets. Our data shows that: 9 patients of 24 resulted in the normal range for the k/L ratio (reference range: 0.26 – 1.65) with both immunological tests. Of the 15 patients with abnormal range revealed with the Binding Site method (BS), only 5 were assessed as pathologic with the New Scientific (NS) method. Interestingly all patients with amyloidosis, were positive with the BS determination and only 2 patients were positive with the NS method. The selected group of subjects, with renal failure and without haematological malignancy were all negative in both tests excepted for one patient ho presented cryoglobulinemia. Concerning the patients with plasma cell disorders, all patients were positive for altered k/L ratio with the BS method and 50% were positive with the NS method. In some cases we were able to compare the data before and after therapy: no modifications were observed when samples were tested with NS, indeed remission after therapy was evident by BS determination. In conclusion our data suggest a good relationship between the Binding Site data and pathology.

173

A PROTEOMIC APPROACH TO THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF SYSTEMIC AMYLOIDOSES

F. Lavatelli¹, G. Sarais¹, D. H. Perlman³, G. Palladini¹, L. Obici¹, D. C. Seldin², V. Bellotti¹, M. Skinner², C. E. Costello³, G. Merlini¹

¹Centro Amiloidosi, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università, Pavia

²Amyloid Treatment and Research Program, Boston University School of Medicine, Boston, USA

³Center for Biological Mass Spectrometry, Boston University School of Medicine, Boston, USA

Introduction. Correct molecular typing of amyloidosis is necessary for designing a therapeutic strategy. We developed a proteomic approach to directly characterize amyloid deposits in abdominal subcutaneous fat from patients with various forms of systemic amyloidoses.

Methods. Fat samples from unaffected volunteers were used as controls. Congo red positive specimens from patients were obtained by fine needle aspiration. Proteins were extracted, separated by 2D-PAGE, immunoblotted or stained, imaged and quantitated using PDQuest. Spots differentially expressed were excised and in-gel digested with trypsin; peptides were subjected to mass spectrometry (MS) on a Micromass Micro-MX or a Bruker Reflex IV MALDI-TOF instruments, spectra were analyzed with MassLynx, and Peptide Mass Fingerprinting was performed using MASCOT.

Results. Samples (10-25 mg) from 16 patients with a known type of amyloidosis were studied (10 AL λ , 2 AL κ , 4 ATTR). In all patients, comparison with control maps allowed identifying novel intense trains of spots, whose position was consistent with the expected migration on the gel of the respective amyloidogenic proteins or fragments. In the 4 AL λ and in the 3 ATTR cases analyzed by MS and/or immunoblotting, these spots proved to be formed by the predicted amyloidogenic proteins. Both in AL and ATTR amyloidosis, the intact precursor and deposited fragments, consisting of multiple C-terminally truncated species of λ light chains and N-terminally truncated transthyretin (TTR) were characterized. Post-translational modifications on the deposited proteins, such as tryptophan 41 oxidation in TTR, were detected. In the 3 ATTR samples analyzed by MS (1 Val122Ile, 2 Val30Met), wild type and variant TTR were shown to be co-deposited in fat tissue, from the coexistence of the peptides containing the mutation and the wild-type ones in the MS spectra.

Conclusions. This sensitive method is suitable to analyze minute amounts of amyloid-infiltrated tissues, and can be usefully applied to the clinical definition of amyloid type.

Reference

Obici L., Perfetti V., Palladini G., Moratti R., Merlini G. Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1753(1):11-22.

174

PROTEOMIC INVESTIGATION OF DISEASE MECHANISMS IN SYSTEMIC AMYLOIDOSES: MARKERS OF TISSUE DYSFUNCTION

F. Lavatelli¹, G. Sarais¹, D. H. Perlman³, G. Palladini¹, L. Obici¹, D. C. Seldin², V. Bellotti¹, M. Skinner², C. E. Costello³, G. Merlini¹

¹Centro Amiloidosi, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università, Pavia

²Amyloid Treatment and Research Program, Boston University School of Medicine, Boston, USA

³Center for Biological Mass Spectrometry, Boston University School of Medicine, Boston, USA

Introduction. The mechanisms underlying tissue dysfunction in systemic amyloidoses are complex and not completely known. We investigated disease-related changes in protein expression in abdominal subcutaneous fat tissue from patients with different types of systemic amyloidoses using a 2D-PAGE and mass spectrometry (MS)-based proteomic approach.

Methods. Fat samples from unaffected volunteers were used as controls. Congo red positive specimens from patients were obtained by fine needle aspiration. Proteins were extracted, separated by 2D-PAGE, stained with silver or Coomassie stainings, imaged and quantitated with PDQuest. Staining and image exposure levels were matched to the total non amyloidogenic protein load and to the intensity of the non amyloid-associated landmark spots. Spots were in-gel digested with trypsin; peptides were subjected to MS on a Bruker Reflex IV MALDI-TOF instrument; spectra were analyzed with Moverz, and Peptide Mass Fingerprinting was performed with MASCOT.

Results. About 100 spots common to the control maps were analyzed by MS and identified by PMF. Samples from 16 patients (4 ATTR, 10 AL λ , 2 AL κ) were studied. In 12 of the patients' samples (3 ATTR, 9 AL), alterations in the expression of the small heat shock protein α B-crystallin were found, in 9 cases (2 ATTR, 1 AL) as a marked decrease in spot intensity. In the remaining 3 cases, the intensity of the α B-crystallin spot was increased, and an additional more acidic isoform of the protein appeared.

Additional novel spots, identified as proteins known to associate with amyloid deposits, as Serum Amyloid P, visible as a train of spots, Apolipoprotein E and Apolipoprotein A-I, were detected in all the patients' samples.

Conclusions. The changes in the expression of α B-crystallin, a protein involved in chaperone activity, may play an important pathogenetic role in systemic amyloidoses.

Reference

Lee S., Carson K., Rice-Ficht A., Good T. Small heat shock proteins differentially affect A beta aggregation and toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347(2):527-533.

175

SERUM ADIPONECTIN IS INCREASED IN PATIENTS WITH SYSTEMIC AL AMYLOIDOSIS

F. Lavatelli¹, G. Palladini¹, G. Sarais¹, P. Russo¹, M. Nuvolone¹, V. Bellotti¹, G. V. Melzi D'Eril³, R. Moratti², G. Merlini¹

¹Centro Amiloidosi, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università, Pavia

²Lab. Biochimica Clinica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università, Pavia

³Dip. di Medicina e Chirurgia, Università, Milano

Introduction. Adiponectin is an adipocyte-specific cytokine whose concentration is inversely related to weight and increases in pathological conditions associated to wasting. In systemic AL amyloidosis, amyloid deposition leads to multiorgan dysfunction, and weight loss is common. Therefore, we studied the serum concentration of adiponectin in AL amyloidosis.

Methods. Total serum adiponectin was measured in duplicate with a solid-phase ELISA assay (Quantikine, R&D Systems) on frozen serum in 44 consecutive AL patients with a positive fat pad biopsy and in 10 controls without tissue amyloid infiltration, weight loss and organ dysfunction. Organ involvement was defined according to the International Society for Amyloidosis guidelines. Differences in continuous variables were tested by the Mann-Whitney U test.

Results. Median (range) age and BMI in patients and controls were 65 y (40-82 y) and 52 y (36-62 y) and 24 Kg/m² (16-32 Kg/m²) and 25.2 Kg/m² (22.7-32 Kg/m²), respectively. Adiponectin was higher ($p < .001$) in patients (median 23.8 $\mu\text{g/mL}$, range 5.2-72.1) than in controls (median 9.6 $\mu\text{g/mL}$, range 4.9-32.1). The serum concentration of adiponectin correlated with the concentration of urinary protein ($p = 0.04$) and of serum alkaline phosphatase ($p = 0.001$). In patients with AL amyloidosis we did not find any correlation of adiponectin with weight loss and cardiac dysfunction assessed by the serum concentration of natriuretic peptide type B.

Conclusions. Adiponectin is increased in AL amyloidosis, particularly in patients with liver and kidney involvement.

References

Clin Chem. 2006;52:797-9.

176

MISURA DELLA LATTATO DEIDROGENASI CON PROCEDIMENTO ANALITICO DI RIFERIMENTO E CON METODI DI ROUTINE: COMMUTABILITÀ DEI MATERIALI DI RIFERIMENTO

G. Cattozzo¹, F. Ceriotti², E. Guerra², A. Calonaci¹, A. Nauti¹, R. Broglio¹, G. De Luca³, C. Franzini⁴

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

²Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano

³Università degli Studi dell'Insubria, Varese

⁴Università degli Studi, Milano

Nel sistema di riferimento proposto da IFCC per rendere confrontabili i valori forniti da metodi diversi per la determinazione di un enzima, i materiali di riferimento (MR) vengono utilizzati per trasferire l'esattezza analitica propria del procedimento analitico di riferimento ai metodi di routine dotati di simile specificità analitica. I MR devono risultare commutabili con i sieri da pazienti (SP), cioè il rapporto tra valori forniti da metodi diversi nell'analisi dei MR non deve differire dal rapporto tra valori forniti dai medesimi metodi nell'analisi dei SP. In questo lavoro si è valutata la commutabilità con SP di 31 MR (21 del commercio, 9 pool di sieri ed il MR primario proposto da IRMM) tra metodi per la determinazione della lattato deidrogenasi (LDH). Abbiamo analizzato SP e MR con il procedimento analitico di riferimento approvato da IFCC (metodo IFCC) e con due metodi commerciali (reagenti ed analizzatore Olympus): uno basato sulla reazione lattato-piruvato (LP) e l'altro sulla reazione piruvato-lattato (PL). In ciascuna coppia di metodi (LP-PL, IFCC-LP e IFCC-PL), i risultati forniti dai due metodi sono stati confrontati mediante analisi della regressione (non-parametrica) e si è valutata la dispersione dei SP calcolando la deviazione standard dei residui (Sy/x); quindi si è valutato lo scostamento dei MR dalla retta di regressione dei SP: se tale scostamento era superiore a $3 Sy/x$, i MR venivano considerati non-commutabili. Nel confronto IFCC-LP tutti i MR sono risultati commutabili; nei confronti LP-PL e IFCC-PL 20 MR (64%) e 7 MR (27%), rispettivamente, sono risultati non-commutabili ed il grado di non-commutabilità appariva correlato con la concentrazione di LDH. Il pool con prevalenza dell'isoenzima 4 è risultato non-commutabile nei confronti LP-PL e IFCC-PL, mentre il pool contenente isoenzima 5 in elevata quantità è risultato non-commutabile nel confronto LP-PL. Non si evidenziava relazione tra stato fisico dei MR e commutabilità. In conclusione, la non-commutabilità è un evento imprevedibile, causato dall'interazione delle caratteristiche dei MR con la robustezza dei metodi analitici. Anche la presenza di enzimi di diversa origine e la composizione isoenzimatica dei MR possono essere causa di non-commutabilità.

177

STANDARDIZZAZIONE DEI METODI PER LA MISURA DELLA LATTATO DEIDROGENASI: CONVERTIBILITÀ DEI VALORI FORNITI DA METODI DIFFERENTIG. Cattozzo¹, A. Calonaci¹, F. Ceriotti², E. Guerra², A. Buratta³, A. Nauti¹, G. De Luca⁴, C. Franzini⁵¹A. O. Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese²Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano³Direzione Generale Sanità Regione Lombardia, Milano⁴Università degli Studi dell'Insubria, Varese⁵Università degli Studi, Milano

Nel processo di standardizzazione, ciascun risultato fornito dai metodi di routine viene reso riferibile al corrispondente risultato misurabile con il metodo di riferimento utilizzando calibratori commutabili. Scopo di questo lavoro è valutare l'accordo tra valori di Lattato deidrogenasi forniti da un metodo lattato → piruvato coerente con la standardizzazione IFCC (LP) e da un metodo piruvato → lattato (PL) armonizzato con LP. Inoltre si è valutato se la standardizzazione dei metodi può migliorare la confrontabilità dei risultati nella VEQ. Abbiamo analizzato con entrambi i metodi 109 sieri da pazienti (SP), distribuiti in un ampio intervallo di concentrazione e con differente composizione isoenzimatica. Tutte le analisi sono state eseguite con analizzatore e reagenti Olympus. I risultati ottenuti nell'analisi dei SP con PL sono stati ricalcolati, utilizzando un calibratore commutabile con il valore assegnato mediante LP. Quindi si valutavano statisticamente la distribuzione dei rapporti [(valore originale PL)/(valore LP)] e [(valore ricalcolato PL)/(valore LP)] e la distribuzione delle differenze [(valore originale PL)-(valore LP)] e [(valore ricalcolato PL)-(valore LP)]. Dopo ricalibrazione, la mediana dei rapporti PL/LP passava da 1,98 a 0,99 e la mediana delle differenze PL-LP passava da 206 a -2 U/L. Per il rapporto PL/LP la differenza inter-quartile passava da 0,05 a 0,02 e la differenza tra i centili 97,5 e 2,5 diminuiva da 0,13 a 0,07. Per la differenza PL-LP la differenza inter-quartile si riduceva da 96 a 4 U/L e la differenza tra i centili 97,5 e 2,5 passava da 508 a 18 U/L. Nell'analisi dei materiali di controllo (MC) utilizzati nella VEQ, la ricalibrazione dei metodi può migliorare la confrontabilità dei risultati se il rapporto tra valori forniti da metodi diversi è stabile. Analizzando i risultati della VEQ della Regione Lombardia nel biennio 2005-2006 abbiamo osservato stabilità del rapporto tra valori forniti dai metodi PL e dai metodi LP (media 2,26; ds 0,10). In conclusione, nell'analisi dei SP i risultati forniti da PL ricalibrato sono riferibili ai risultati misurati con LP. La ricalibrazione dei metodi PL può consentire migliore confrontabilità con i risultati forniti dai metodi LP nella VEQ.

178

DOSAGGIO DELLE ISOFORME DELLA TRANSFERRINA SERICA UMANA MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE PER LA DIAGNOSI DI SOSPETTA RINOLICQUORREA RECIDIVANTE IN PAZIENTE OPERATO DI NEOPLASIA CEREBRALEG. Falliti¹, V. Impallomeni¹, O. Raffa¹, A. Barrilà¹, L. Creazzo¹, S. Bonanno¹, A. Maccarrone¹, F. Vaccaro¹¹Servizio di Patologia Clinica, Azienda Ospedale Piemonte, Messina

La Transferrina, glicoproteina deputata al trasporto di ferro, è sintetizzata nel fegato ed è presente in diverse isoforme. L'isoforma disialo è formata da una catena N-glicanica a forma di biantenna con due residui d'acido sialico, mentre l'isoforma asialo manca della struttura di carboidrati. L'asialotransferrina, chiamata anche Beta 2-transferrina, è un marcatore proteico per la rilevazione di Liquor Cerebrospinale (CSF) in escrezioni provenienti da naso, orecchie, ferite del collo e della testa. E' possibile dosare le isoforme della Transferrina con vari metodi: a) Turbidimetria; b) Nefelometria; c) Immunometria; d) HPLC; e) Elettroforesi ad alta risoluzione; f) Elettroforesi capillare. E' giunta alla nostra osservazione una paziente operata per un Craniofaringioma cerebrale esitato per ben due volte in episodi di fistola liquorale recidivante. La paziente consegna in Laboratorio un liquido limpido ignoto raccolto dalle cavità nasali con l'obiettivo di scoprire se si tratti di Liquor cerebrospinale da fistola. E' stato eseguito il dosaggio delle Isoforme della Transferrina mediante Elettroforesi capillare in fase libera su strumentazione Capillarys, Sebia. Con questa tecnica le molecole cariche sono separate secondo la loro mobilità elettroforetica in un tampone alcalino a pH specifico e lettura diretta delle proteine. Il campione è stato dosato in parallelo al siero della stessa paziente ed a un Liquor di riferimento. La lettura diretta sul capillare a 200 nm ha permesso di definire le percentuali relative delle Isoforme della Transferrina nel campione ignoto della paziente. La somma delle componenti oligosialilate non ha superato il valore di soglia dell'1.3% e sono state riscontrate una netta componente Asialilata ed una componente Monosialilata, quest'ultima solitamente non presente nel siero umano normale ma indispensabile per la diagnosi di certezza di Liquor. La velocità di esecuzione del test, rispetto all'HPLC, la precisione derivante dalla lettura diretta delle proteine e la semplicità d'uso del sistema strumentale ci hanno consentito la rapida soluzione di un caso di complicanza di fistola liquorale post intervento per craniofaringioma cerebrale.

Bibliografia

Clin Chem Lab Med 45 (4):558-562,2007

179

LIVELLI DI OMOCISTEINA E PROTEINA C REATTIVA: FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE IN PAZIENTI CON IPERCOLESTEROLEMIA E NORMOCOLESTEROLEMIA

L. Loiodice¹, M. Tampoia¹, V. Ruggieri¹, A. Zucano¹, A. Verna¹, A. Colacicco¹, F. Di Serio¹

¹Lab. Patologia Clinica I, Osp Policlinico, Bari

Scopo dello studio. L'iperomocisteinemia è un fattore di rischio cardiovascolare per l'insorgenza di ictus e malattie tromboemboliche. Elevati livelli danneggiano le pareti vascolari tanto quanto l'ipercolesterolemia. Scopo dello studio è stato valutare i livelli plasmatici di omocisteina (HCY) e di proteina C reattiva (PCR), quali fattori di rischio cardiovascolare in pazienti con o senza ipercolesterolemia.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 51 soggetti con ipercolesterolemia, età media 49,9 aa, range età 9-84 aa (gruppo A: 16 maschi e 35 femmine) e 100 soggetti con normocolesterolemia, età media 47 aa, range età 5-81 aa (gruppo B: 41 maschi e 59 femmine). Il dosaggio dell'omocisteina è stato eseguito con metodica immunologica a competizione su nefelometro BN2 (Dade Behring), il dosaggio della PCR con metodica immunoturbidimetrica su Dimension (Dade Behring).

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il test di Pearson per le correlazioni e il t-test per le comparazioni. Risultati. La concentrazione media di HCY e di PCR nei soggetti con ipercolesterolemia è stata di $9.9 \pm 3.3 \mu\text{moli/l}$ e di $4.0 \pm 0.85 \text{mg/l}$ rispettivamente; nei soggetti con normocolesterolemia è stata di $10.5 \pm 5 \mu\text{moli/l}$ e di $3.9 \pm 0.97 \text{mg/l}$ rispettivamente: $P = 0.80$ per HCY e $P = 0.43$ per PCR. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra livelli di colesterolo e HCY e tra livelli di colesterolo e PCR nei due gruppi studiati: ipercolesterolemici (gruppo A-HCY: $P = 0.31$, $r = 0.14$; PCR: $P = 0.70$, $r = 0.05$) e normocolesterolemici (gruppo B-HCY: $P = 0.48$, $r = -0.07$; PCR: $P = 0.42$, $r = -0.08$).

Una correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra i livelli di HCY e di PCR, $P = 0.04$ nei soggetti ipercolesterolemici e $P < 0.0001$ nei soggetti normocolesterolemici.

Conclusioni. I livelli di HCY sono associati ai livelli di PCR in soggetti con iper e normocolesterolemia. Non vi è tuttavia una relazione diretta tra livelli di HCY e PCR e livelli di colesterolo. La valutazione dei fattori di rischio cardiovascolare necessita sempre di uno studio multiparametrico.

Bibliografia

Pearson TA et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. *Circulation* 2003;107:499-511

180

INTERFERENZA NEL DOSAGGIO DELLA LATTATO DEIDROGENASI: DIFFERENZA TRA PLASMA E SIERO

M. Daves¹, G. Cosio¹, E. Peer¹, A. D'Angella¹, F. Rizza¹

¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria dell'Alto Adige, Comprensorio Sanitario di Bolzano

Scopi. Vogliamo evidenziare un problema di interferenza analitica nel dosaggio della lattato deidrogenasi (LDH) in relazione al tipo di matrice utilizzata.

Metodi e risultati. Viene eseguita la determinazione della LDH ad una paziente di 5 anni ricoverata in pediatria per una polmonite con versamento in terapia antibiotica (azitromicina, amicacina, cefotaxima). Il dosaggio viene eseguito su plasma litio-eparina con strumento Synchron LX20 (Beckman-Coulter) con metodo cinetico enzimatico. Nella reazione la LDH riduce il piruvato a lattato con concomitante ossidazione di NADH a NAD⁺ e lettura dell'assorbanza a 340 nm.

Lo strumento non fornisce un valore numerico ma "Oir Low" come avviene in caso di concentrazioni al di sotto del limite di sensibilità analitica che per tale metodo è 20 IU/L (range analitico 20-2500 IU/L). Vengono ripetute le determinazioni ma i risultati sono confermati. Nonostante l'allarme Oir Low, decidiamo di effettuare una diluizione 1:4 e otteniamo un valore di 700 IU/L, valore confermato effettuando ulteriori diluizioni (1:5, 1:10). Contattiamo la pediatria per farci inviare nuovamente un campione di plasma, ma questa volta chiediamo anche una provetta da siero. Ripetiamo le determinazioni che su plasma risultano ancora "Oir Low" mentre sul campione di siero otteniamo un valore di 680 IU/L. Effettuando nuovamente le diluizioni sul secondo campione di plasma vengono confermati i valori ottenuti sul campione di siero.

Conclusioni. In questo particolare caso l'interferenza che non consente il dosaggio su plasma litio-eparina sembra essere in relazione all'anticoagulante. Sul campione di siero tale fenomeno non si presenta. In entrambe le provette (Terumo) da siero e con litio eparina è presente il gel separatore. Probabilmente l'effetto dell'anticoagulante associato alla presenza degli antibiotici interferisce col metodo, cosa che viene risolta dalla diluizione del campione nonostante la concentrazione di LDH non richiederebbe di per se tale procedura.

Bibliografia

Herzum I, Bänder R, Renz H, Günther H. Reliability of IFCC Method for Lactate Dehydrogenase Measurement in Lithium-Heparin Plasma Samples. *Clin Chem* 2003;49;12:2094.

181

MONITORAGGIO DI MM IgD CON ELETTROFORESI IN GEL D'AGAROSIO (AGE)M. Falcone¹, S. Tappi¹, S. Petti¹, A. M. Celozzi¹, F. Simone¹, S. Capalbo¹¹SC 1° Laboratorio Analisi cliniche, Azienda Ospedaliero Universitaria OO.RR. di Foggia, Foggia²SC Ematologia

La ricerca delle CM mediante l'elettroforesi proteica (EL) in gel d'agarosio è una attività rilevante. Presso il 1° Lab. Analisi Cliniche degli OO. RR., si eseguono circa 4000 EL al mese e si riscontrano circa 100 CM. Persiste ancora la consuetudine di chiedere l'EL prima di eseguire una contrastografia, nonostante l'ultima pubblicazione del NEJM vol. 354 n.4 (379) non citi tale esame.

Obiettivi della ricerca: monitorare la scomparsa di una CM IgD in B2 mediante AGE (kit di Alfa Wassermann).

Mentre è agevole la misura di una CM che migri in zona gamma, si incontrano difficoltà a quantizzare CM che migrano in B1 o B2 per la presenza di altre proteine.

Presso il 1° Lab. è pervenuta una richiesta di IFE di un paziente della Ch. Tor. (dicembre 2005). L'EL mostrava un aumento di B2 e un lieve calo delle gamma. La IFE estesa IgD ed IgE evidenziava una CM IgD. Il paziente trasferito in Ematologia con diagnosi di MM IgD, è stato curato e sottoposto ad autotrapianto di midollo osseo.

Dopo la identificazione della CM si sono ricercati altri tracciati EL. L'EL presentavano i seguenti valori al densitogramma della zona B2 (val. norm. 3.5 – 7%):

date esami:30/06 12/10 03/11 07/11 21/12 21/12 23/12 28/12 30/12 10/01 21/01

valori B2% 5.56 – 11.03 – 12.65 – 13.04 – 11.1 – 11.28 – 10.31 – 8.79 – 8.69 – 6.78 – 5.82

La frazione B2 calava conseguentemente all'autotrapianto effettuato e alle cure, fino ad osservare la normalizzazione della frazione stessa. L'IFE non mostrava più la CM IgD dopo circa 3 mesi. Fino al mese 05/07 il paziente non mostrava una CM IgD e la B2 risultava nei valori normali.

Le tecniche di laboratorio sono riuscite a monitorare il calo della CM e la finale scomparsa della CM IgD nonostante la migrazione della CM in B2. L'attenta ispezione visiva dei tracciati in AGE conserva sempre una rilevante importanza nonostante si osservi un incalzare sul mercato di nuove tecniche elettroforetiche, l'AGE rimane il metodo di riferimento o la tecnica a cui confrontarsi.

Bibliografia

Measurement of B1 and B2 globulins improves detection of M-spikes on high-resolution electrophoresis. Sirinivas Narayan and all. Clinical Chemistry 49, No. 4, 2003

182

UNA RETE NEURALE PUO' REALMENTE AIUTARE LA REFERTAZIONE DELL'ELETTROFORESI SIEROPROTEICA? VALUTAZIONE DEL SISTEMA NEUROSOFT NELLA PRATICA CLINICAM. Varagnolo¹, S. Altinier¹, M. Zaninotto¹, A. Liverani¹, A. Vernocchi², C. Ottomano³, M. Plebani¹¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio Azienda Ospedaliera - Università, Padova²Ospedale Pierantoni, Forlì³Ospedali Riuniti, Bergamo

L'introduzione dell'elettroforesi capillare nella valutazione del pattern sieroproteico ha migliorato qualitativamente tale analisi, che, però, per quanto attiene l'interpretazione densitometrica rimane totalmente a carico dell'operatore. Scopo del nostro lavoro è stata la valutazione di NEUROsoft (SEBIA), un sistema esperto costituito da 6 reti neurali (1 per ciascuna frazione), costruito su algoritmi matematici, in grado di discriminare e selezionare l'elettroforesi patologiche sulla base di criteri morfologici.

NEUROsoft è stato fornito con una base di conoscenza costruita utilizzando 2600 frazioni densitometriche, e può essere aggiornata sulla base d'ulteriori informazioni elettroforetiche.

Nel nostro studio gli operatori esperti di 3 diversi laboratori (Padova, Forlì, Bergamo) hanno valutato ciascuno 1000 elettroforesi sieroproteiche eseguite con metodo capillare (SEBIA) comparandole in seguito con la classificazione di NEUROsoft (base di conoscenza).

Sono stati evidenziati 56 tracciati discordanti (normali per NEUROsoft e patologici per gli operatori): 10 nella frazione albuminica, 12 in beta 1, 8 in beta 2 e 26 in zona gamma-globulinica.

I 3000 tracciati valutati sono entrati a far parte della base di conoscenza, ed in seguito sono valutate ulteriori 1000 elettroforesi, riducendo in questo modo le discordanze a soli 4 casi (2 in zona albuminica e 2 in zona gamma-globulinica). La sensibilità, intesa come proporzione dei tracciati normali correttamente identificati, è risultata essere compresa tra l'88 ed il 99% per gli operatori e del 97% per NEUROsoft.

Tale esperienza evidenzia la possibilità di utilizzare NEUROsoft in maniera efficiente, soprattutto grazie alla possibilità di aumentare la base di conoscenza e quindi di istruire in maniera continuativa le reti neurali. Tale metodologia, oltre a ridurre il tempo utilizzato, renderebbe maggiormente standardizzata l'interpretazione.

183

STUDIO DELLE SOTTOCLASSI NELLA PARAPROTEINEMIA DI TIPO IgG

M. R. Favaroni², G. Salerno³, A. Tammeo², L. Portaro³, P. Cardelli¹

¹Dipt. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, II Facoltà di Medicina Università "La Sapienza", UOC Diagnostica di Laboratorio Az. Ospedaliera S. Andrea di Roma

²II Facoltà di Medicina Università "La Sapienza", UOC Diagnostica di Laboratorio Az. Ospedaliera S. Andrea di Roma

³UOC Diagnostica di Laboratorio Az. Ospedaliera S. Andrea di Roma

Le paraproteine comprendono un gruppo eterogeneo di forme caratterizzate dalla presenza nel siero e/o nelle urine di una o più componenti monoclonali e/o componenti incomplete, come catene leggere o pesanti isolate.

Scopo. Analizzare il tipo e la distribuzione delle sottoclassi in 80 sieri umani con componente monoclonale IgG.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 80 pazienti (26 MM; 54 MGUS) con componente monoclonale IgG dimostrata mediante immunofissazione su gel di agarosio utilizzando antisieri anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, K, L (Hydrasis SEBIA). Le IgG sottoclassi sono state separate con elettroforesi su gel di agarosio e tipizzate con antisieri monospecifici anti-IgG1-4 (Dade Behring). Su tutti i pazienti sono state dosate le sottoclassi delle IgG con metodo nefelometrico (BNII Dade Behring)

Risultati. L'analisi della totalità della popolazione presa in esame (MM+MGUS) presenta per l'85% una componente IgG1; per il 10% una componente IgG2; per il 2,5% una componente IgG3 e per il 2,5% una componente IgG4. Nei pazienti con MM l'85% presenta un pattern di tipo IgG1 ed il 15% un pattern di tipo IgG2 mentre nei pazienti con MGUS il 78% ha una componente monoclonale IgG1, il 18% IgG2, il 2% IgG3 ed il 2% IgG4. Se si considerano le 2 sottopopolazioni, confrontando i risultati analitici ottenuti con le diverse metodiche utilizzate (dato densitometrico vs valore nefelometrico della sottoclasse), si evidenzia che i pazienti con MM hanno un andamento concordante con una correlazione lineare pari a $r^2 = 0.89$ mentre nei pazienti con MGUS l'andamento mostra una correlazione inferiore con un $r^2 = 0.73$.

Conclusione. Nei pazienti con MM si osserva una buona correlazione tra il dato densitometrico e la determinazione nefelometrica, mentre nei pazienti con MGUS il coefficiente di correlazione sembra essere ai limiti della significatività. Questi dati preliminari sembrano essere incoraggianti per il corretto inquadramento diagnostico dei pazienti con MM, mentre per quanto riguarda i pazienti con MGUS, il quadro più eterogeneo necessita di ulteriori approfondimenti.

Bibliografia

Klouche M, Bradwell AR, Wilhelm D, Kirchner H
"Subclass Typing of IgG PARaproteins by Immunofixation Electrophoresis" Clin Chem, 41/10, 1475-1479 (1995)

184

LA PROTEINURIA GLOMERULARE VALUTATA ATTRAVERSO IL PROTIS: UN CASO CLINICO

N. Di Pietro¹, E. Tucci¹, M. Scapaticci¹, R. Santoro¹

¹Lab. Analisi, Osp. G. Bernabeo, Ortona, Chieti

Introduzione. La proteinuria glomerulare si verifica quando il glomerulo perde la capacità di filtrare le proteine plasmatiche, in tal caso il riassorbimento tubulare proteico aumenta. Essa si distingue in selettiva e non selettiva. Il sospetto di proteinuria viene spesso evidenziato dalla presenza nelle urine, di proteine e sangue. La diagnosi è confermata dall'elettroforesi proteica. Un sistema più veloce ed economico potrebbe essere l'uso del software PROTIS che rielabora pochi analiti per dare una interpretazione oggettiva.

Materiali e metodi. Sono state utilizzate: l'elettroforesi proteica ad alta risoluzione (Sebia), il dosaggio delle proteine e l'esame chimico fisico e del sedimento delle urine. I dati ottenuti sono stati inseriti nel software PROTIS (Dade Behring) per la rielaborazione.

Risultati. In questo lavoro sono stati valutati 150 campioni per la diagnosi delle nefropatie. Per semplicità si riporta come esempio un caso clinico con valori elevati di PtU (2400 mg/l), di AlbU (1800 mg/l), di IgG (140 mg/l), di α 1-microglobulina (71 mg/l), valori nella norma di l' α 2- macroglobulina (2,5 mg/l), presenza di eritrociti. Il software ha evidenziato una proteinuria glomerulare non selettiva, una proteinuria tubulare ed una ematuria renale. L'elettroforesi urinaria eseguita sul campione ha mostrato una proteinuria mista.

Conclusioni. In base alla nostra esperienza abbiamo verificato che l'uso di questo software e l'elettroforesi sono sovrapponibili nella routine del laboratorio analisi. Inoltre il sistema permette la diagnosi precoce e il monitoraggio della malattia/terapia, costituisce un ottimo aiuto nell'interpretazione dei risultati per gli specialisti, contiene un buon archivio dati. La presenza di casi clinici particolari richiede il confronto e/o il completamento dei risultati con l'elettroforesi ad alta risoluzione su agarosio o con l'elettroforesi su SDS, che comunque rappresentano il golden standard.

Bibliografia

Guder WG. Proteinuria: causes, forms and methods of determination. Clin Diag Lab 1988;1-68.

185

HAPTOGLOBIN PHENOTYPING BY IMPROVED INTERPRETATION OF CZE SERUM PROTEIN ELECTROPHEROGRAMR. Guerranti¹, E. Bertocci¹, C. Muzzi¹, R. Leoncini¹, M. Salvi², R. Morelli², R. Pagani¹¹*Dip Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Università degli Studi di Siena*²*Lab Analisi Cliniche - Azienda Ospedaliera Universitaria Senese*

Aim. Haptoglobin (Hpt) strongly influences the serum protein electropherogram and the large structural variability of the Hpt phenotype accounts for their different electrophoretic mobility. The association of characteristic capillary electrophoretic profiles with Hpt phenotype was analyzed.

Methods. Samples were separated by capillary zone electrophoresis on Sebia Capillary instrument and electropherograms obtained either with Protein 6 and the high resolution (HR) reagents were compared with Hpt phenotype determined by western-blot.

Results. After Protein 6 separation samples were classified in 2 groups according to their α_2 electrophoretic profiles: 116 profiles were classified as $1\alpha_2$ (1 or 2 not resolved peaks) and the other 86 as $2\alpha_2$ (2 resolved peaks). A significant negative association between the α_2 profile and the Hpt phenotype was obtained ($\chi^2 = 154,06$, $p < 0.0001$); 2.6% of Hpt 1-1 and 2.3% of Hpt 2-2 were associated respectively with $1\alpha_2$ or $2\alpha_2$ profile. With HR method was found a significant difference between the peak mobility of Hpt 2-2 and Hpt 1-1 with a cutoff of 155.5 as determined by ROC curve (AUC=0.9767, 95% CI 0.9503-1.003, $P < 0.0001$, SE 0.01346, likelihood ratio of 21.39.) with sensitivities of 98.73% (93.15-99.97, 95% CI) and specificity of 95.38% (87.10-99.04, 95% CI). With both separations it was not possible identify Hpt 1-2.

Conclusion. The most clinically important Hpt phenotypes can be identified in CZE by negative association (NON 1-1, NON 2-2) with a specific Protein 6 α_2 profile or by Hpt peak mobility after HR separation.

References

Hossein Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol* 2004;121:S97-S104

186

DOSAGGIO DELLA TRANSFERRINA DESIALATA (CDT) IN MEDICINA DEL LAVOROR. Maiavacca¹, N. Failla¹, A. Todaro², L. Bordini², M. G. Ratti¹, M. G. Meroni¹, E. Torresani¹¹*Lab. Centrale Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena*²*Clinica del Lavoro "Luigi Devoto", Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena*

La CDT viene utilizzata come marcatore di abuso alcolico cronico con valenza medico legale. Il nostro Laboratorio esegue il dosaggio della CDT in elettroforesi capillare (CAPILLARYS SEBIA) che separa le isoforme della transferrina, in modo automatizzato e con buone performance.

Sulla base del DM 23febbraio1999 n°88(norme concernenti l'accertamento ed il controllo dell'idoneità fisica e psico-attitudinale del personale addetto a pubblici servizi di trasporto) e del provvedimento Legislativo n.125 del 30 marzo 2001 (divieto di somministrazione e di assunzione di bevande alcoliche nei luoghi di lavoro) viene considerata l'esperienza maturata, nel periodo gennaio 2005-agosto 2006, su 1251 dipendenti, più del 90% maschi, addetti alla conduzione di mezzi di trasporto su gomma e rotaia appartenenti ad un'azienda di trasporto pubblico della Lombardia.

Il dosaggio della CDT, effettuato di routine nelle visite di assunzione, è eseguito in routine anche per le visite periodiche dall'entrata in vigore del Provvedimento 16 marzo 2006 (attività lavorative che comportano un elevato rischio di infortuni sul lavoro ovvero per la sicurezza, l'incolumità o la salute dei terzi)

Sono state esaminati 222 soggetti (18% su visite di ammissione e 82% su visite di revisione).

I valori di CDT sono risultati superiori al cut-off stabilito dal metodo (1.3%), senza alterazioni di AST, ALT, gammaGT e MCV, in 24 casi (11%), 15 in visita di ammissione e 9 di revisione, questi ultimi normalizzati nella rivalutazione a distanza di 6 mesi, consentendo il reinserimento lavorativo del dipendente.

Dei soggetti con CDT elevata, mentre 4 su 9 (44%) al controllo riferiva un consumo abituale di 1-2 bicchieri di vino a pasto, 14 su 15 (93%) all'assunzione riferiva invece una sostanziale astensione dal consumo di alcolici e nessuno riferiva consumi superiori a 2 bicchieri di vino a pasto o episodi di "binge drinking".

Pertanto l'utilizzo della CDT, unitamente agli altri accertamenti integrativi effettuati, ha comportato la formulazione di un giudizio di non idoneità all'attività di conducente con conseguente non ammissione o allontanamento dall'attività di guida e consente la definizione di protocolli per l'identificazione e il monitoraggio dell'abuso alcolico cronico in ambito lavorativo.

187

THE BACTERIAL VAGINOSIS PARADOX: HYDROLYTIC ENZYMES CORRELATE WITH INTERLEUKIN-1BETA BUT NOT WITH INTERLEUKIN-8

M. Di Santolo¹, K. McCollum², J. F. Culhane², S. Cauci¹

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

²*Department of Obstetrics and Gynecology, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, USA*

Objective. To explore mechanisms of local innate immunity induction and modulation in pregnant women with bacterial vaginosis (BV), a disorder associated with increased risk of preterm birth and HIV acquisition.

Study design. A total of 200 singleton pregnant women in early gestation (12±4 weeks) with BV (Nugent 7-10) without concurrent vaginal infections with *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, syphilis, and yeast. Concentrations of vaginal IL-1 β and IL-8, number of neutrophils, and levels of sialidase and prolidase hydrolytic enzymes were determined in vaginal fluid.

Results. Concentrations of vaginal IL-1 β had a strong positive correlation with levels of sialidase (P<0.001) and prolidase (P<0.001). Conversely, such enzymes were negatively correlated with the ratio of IL-8/IL-1 β (both P<0.001), and were not significantly associated with concentrations of IL-8. Notably, number of vaginal neutrophils had a negative correlation with sialidase (P=0.007).

Conclusions. The strong induction of IL-1 β in BV positive women appears to be associated with the production of the hydrolytic enzymes sialidase and prolidase by BV-associated bacteria. However, these two enzymes may inhibit the expected amplification of the proinflammatory IL-1 β cascade as evaluated by the down-regulation of the IL-8/IL-1 β ratio. A blunted response to IL-1 β signals may cause the poor rise of neutrophils, which is peculiar to BV. This impairment of local defense may contribute to increased susceptibility to adverse outcomes such as preterm birth and low birth weight in BV positive pregnant women.

188

VALIDAZIONE DI UN METODO SPETTROFOTOMETRICO PER LA DETERMINAZIONE DELL' OMOCISTEINA TIOLATTONASI NEL SIERO UMANO

S. Iona¹, R. Massoud¹, C. Cortese¹, P. Casalino¹, G. Federici¹

¹*Dip. di Medicina Interna, Biochimica Clinica, Università Tor Vergata, Roma*

Introduzione. L'omocisteina tiolattonasi (HTLase) è un enzima che catalizza l'idrolisi della forma lattonica dell'omocisteina; questa forma di omocisteina può interagire con la struttura delle proteine attraverso un processo di omocisteinilazione dei residui di lisina e conseguente implicazione nei meccanismi di sviluppo di patologie cardiovascolari, alterazioni neurodegenerative e aterosclerosi.

Metodo. L'HTLase del siero è stata misurata apportando lievi modifiche al metodo di Ellman applicando come substrato il γ -tiobutirrolattone.

Risultati. La precisione intraserie e interserie è stata valutata utilizzando pool di sieri umani, il valore dell'attività tiolattonasica era misurata in duplicato (n=15) e la deviazione standard relativa era di 1.8% e 4.5% per il dosaggio intraserie e interserie rispettivamente. L'analisi della regressione lineare ottenuta in un intervallo compreso tra 13.3 U/L e 558.5 U/L ha fornito un valore di R2 di 0.999 con un'equazione della retta corrispondente a $y = 3.68x + 1.61$. L'accuratezza del metodo determinata attraverso prove di recupero su un pool di sieri con attività media tiolattonasica di 325 U/L ha dato valori intorno al 99%. Il limite di rilevanza inteso come media + 3SD di 14 replicati del bianco reagente era di 8 U/L. L'intervallo di riferimento ottenuto su 60 campioni di siero prelevato da soggetti apparentemente sani era tra 149 U/L e 389 U/L con una media \pm 2SD di $269 \pm 2 \times 60$. Il test di normalità di Kolmogorov Smirnov era statisticamente significativo con un valore di p maggiore di 0.05, indicando una normale distribuzione dei dati.

Conclusioni. La determinazione dell'HTLase nel siero umano mediante il metodo descritto è riproducibile e accurato, i dati di linearità, recupero e stabilità sono soddisfacenti. Questo metodo semplice e rapido potrebbe essere impiegato nella routine di laboratorio utilizzando un sistema analitico automatico di chimica clinica.

Bibliografia

Tetsuya Kosaka et al. Investigation of the relationship between atherosclerosis and paraoxonase or homocysteine thiolactonase activity in patients with type 2 diabetes mellitus using a commercially available assay. Clin Chim Acta 359,(2005)156-162.

189

EVALUATION OF ASYMMETRIC DIMETHYLARGININE (ADMA) AND SYMMETRIC DIMETHYLARGININE (SDMA) IN PATIENT WITH ERECTILE DYSFUNCTION (ED)

A. Barassi¹, R. Paroni¹, I. Fermo², M. L. Biondi³, F. Pateri³, I. Pisani³, R. Pavlovic¹, G. Piediferro⁴, G. M. Colpi⁴, G. V. Melzi d'Eril¹

¹Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano, Milano

²Unità di Tecniche Separative, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

³Laboratorio di Analisi, Ospedale San Paolo, Milano

⁴Unità di Andrologia, Ospedale San Paolo, Milano

Aim. The aim of the present study was to investigate the concentrations of ADMA and SDMA in patients with arteriogenic and non arteriogenic ED.

Patients and Methods. This study including 29 males (mean age 46y, range 19-63y), undergoing eco colour Doppler assessment of cavernosal arteries, used in conjunction with intracavernous injection (ICI) of prostaglandin E1 to induce an erection, and 30 (all male, mean age 43y, range 20-73y) healthy controls. The Doppler parameter of peak systolic velocity (PSV) was recorded 5, 10, and 20 min after ICI. Arteriogenic ED was diagnosed when the PSV was less than 25 cm/s. ADMA and SDMA were assayed by HPLC (1). Plasma (0.1 mL) was added with L-homoarginine as internal standard and applied to a pre-activated cation-exchange SPE cartridge (Phenomenex STRATA SCX) on a vacuum system. After washings with TCA 2%, phosphate buffer pH 8.0 and methanol, the amino acids were eluted with 1mL of triethylamine solution in methanol:water (70:30, v:v). The eluate was dried under nitrogen, dissolved in 0.1 mL bi-distilled water, derivatized with the OPA reagent and injected into an HPLC equipped with an Ultrasphere ODS column (250x4.6mm, 5 μm) protected by a guard-column LiChrospher RP-18 and a fluorescent detector (λ_{exc} 340 nm, λ_{em} 455 nm). The gradient analysis was performed at a flow-rate of 1.1mL/min with a mobile phase consisting of A (sodium citrate buffer, 50mmol/L, pH 6.2) and B (distilled water: acetonitrile:methanol; 1:2:2; v:v:v). The total run time was 32 min.

Results. The mean ADMA and SDMA levels (mean±SD) were significantly higher in patients with ED [0.56±0.13 mmol/L (p=0.003) and 0.68±0.16 mmol/L (p=0.001), respectively] than in healthy controls [0.47±0.12 mmol/L and 0.46±0.08 mmol/L, respectively]. A statistical significant association between patients with arteriogenic [0.55±0.12 mmol/L and 0.65±0.12 mmol/L, respectively] and non arteriogenic ED [0.56±0.13 mmol/L and 0.67±0.18 mmol/L, respectively] was not found (p>0.05).

Discussion and conclusion. Our preliminary data show increased levels of ADMA and SDMA in patients with ED compared to healthy subjects, but ADMA and SDMA concentrations do not appear correlated with ED etiology.

Reference

1. Paroni R, et al. *Amino Acids* 2005;28:389–394.

190

EVALUATION OF MICROALBUMINURIA IN PATIENTS WITH ERECTILE DYSFUNCTION

A. Barassi¹, W. Porreca², M. Ramella², L. Chiaravalotti², D. Sotgia², C. Cappati², G. Piediferro³, G. M. Colpi³, G. V. Melzi d'Eril¹

¹Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

²Laboratorio di Analisi, Ospedale San Paolo, Milano, Italy

³Unità di Andrologia, Ospedale San Paolo, Milano, Italy

Aim. Microalbuminuria, defined as a urinary albumin concentration (UAC) of 20–200 mg/L, is a marker of extensive endothelial dysfunction and play a key role as a potential cardiovascular and atherosclerotic risk factor. It has been suggested that endothelial dysfunction is linked to erectile dysfunction (ED) as they share a dependence on a common pathway through the release of nitric oxide (NO) (1). The aim of this study was to investigate the microalbuminuria in patients with arteriogenic and non arteriogenic ED.

Patients and Methods. This study including 80 males [mean age 45 years, range 17-70] which underwent echo color Doppler assessment of cavernosal arteries, used in conjunction with intracavernous injection (ICI) of prostaglandin E1 to induce an erection. The Doppler parameter of peak systolic velocity (PSV) was recorded 5, 10, and 20 min after ICI. Arteriogenic ED was diagnosed when the PSV was less than 25 cm/s. All participants gave written informed consent. Urinary albumin concentration was measured on a Behring Nephelometer II analyzer (Dade Behring). The within-run %CV of the determination (n=40) and the between-run %CV (n=15) were 4.1 at 49.2 g/L and 3.9 at 43.6 g/L, respectively. The detection limit was 0.011 g/L. **Results.** The 80 males were classified in two groups: 30 patients with arteriogenic ED [PSV < 25 cm/s, mean age 52 years, range 26-70] and 50 patients with non arteriogenic ED [PSV > 35 cm/s, mean age 39 years, range 17-63]. In the first group, UAC was < 0.011 g/L in 20 patients (66.7%) and > 0.011 g/L in 10 patients (33.3%). In these patients the mean was 0.035 (range 0.013-0.115) g/L. In the second group, UAC was < 0.011 g/L in 41 patients (82%) and > 0.011 g/L in 9 patients (18%). In these patients the mean was 0.037 (range 0.013-0.099) g/L. UAC was not significantly (p>0.05) different between patients with arteriogenic (n=10) and non arteriogenic (n=9) ED at least in the patients with UAC > 0.011 g/L. **Discussion and conclusion.** Our preliminary data show that microalbuminuria, measured with the present method, was not a good marker for ED of vascular etiology.

Reference

1. Fry DL, et al. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1193–204.

191

ASSOCIATION BETWEEN ANGIOTENSIN I - CONVERTING ENZYME GENE INSERTION/DELETION POLYMORPHISM AND THROMBOEMBOLIC DISEASE

B. Lo Sasso¹, C. Scazzone¹, A. Caruso¹, G. Mingoia¹, S. Cammarieri¹, E. Lio¹, M. Ciaccio¹

¹*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

Introduction. Angiotensin I - Converting Enzyme (ACE) exists mainly in the endothelial cells of the whole body and it plays an essential role in two physiological systems, one leading to the production of angiotensin II (a potent vasoconstrictor), and the other to the degradation of bradykinin.

Most studies focused on an insertion/deletion (I/D) polymorphism in intron 16 of the human ACE gene, which has been reported to be related to the levels of the circulating enzyme. In particular, the serum ACE level tends to be higher according to the ACE genotype in the order II < ID < DD. Some studies have reported a potential role of ACE in the pathogenesis of thromboembolic disease (1).

Materials and Methods. We evaluated the genotypes of ACE in 89 subjects with thromboembolic disease and in 34 healthy subjects. Genotypes were determined by the polymerase chain reaction (PCR). The PCR product is a 190-bp fragment in the absence of the insertion and a 490-bp fragment in the presence of the insertion.

We have used the agarose gel electrophoresis to identify the DD, ID or II genotype.

Results. The distribution of the DD, ID and II ACE genotypes was respectively 46%, 38.3% and 15.7% in subjects with thromboembolic disease, while in control subjects was 38.2% DD, 55.9% ID and 5.9% II.

Discussion. These results suggest that there are no significant differences in the distribution of the DD, ID and II ACE genotypes between patients with thromboembolic disease and control subjects.

However the role of these mutations in thromboembolic disease remains to be clarified by further studies.

References

1. F.A. Sayed-Tabatabaei et al. *Circ Res*, 2006;98:1123-1133.

192

SCREENING DEL SANGUE OCCULTO NELLA POPOLAZIONE DELLA PROVINCIA DI LODI

C. Fontanella¹, F. Pavesi¹, L. Cerutti¹, A. Anesi¹, A. Montani², P. Votta³

¹*Struttura Laboratorio Analisi Lodi e S. Angelo Lodigiano, A.O. della Provincia di Lodi*

²*Struttura Laboratorio Analisi di Casalpuusterlengo e Codogno, A.O. della Provincia di Lodi*

³*U.O. di Endoscopia Digestiva Presidio Ospedaliero di Lodi, A.O. della Provincia di Lodi*

Il tumore del colon retto è situato al terzo posto per numero di decessi dopo il tumore alla mammella e quello del polmone nell'uomo. La riduzione delle morti riscontrabile negli ultimi anni è dovuta ad una serie di fattori quali: attenzione per i comportamenti a rischio, adeguata informazione, diagnosi precoce, miglioramenti nella terapia e programmi di screening. Nel Lodigiano è stato attivato un programma diretto a tutti i cittadini compresi nella fascia d'età da 50 a 69 anni che vengono invitati ad aderire gratuitamente ad un'indagine di primo livello quale la presenza di sangue occulto nelle feci e, se positivi, ad ulteriori accertamenti.

Lo strumento utilizzato per la determinazione del sangue nelle feci è l'OC-SENSOR m Alfa Wassermann. Il metodo utilizzato è immunologico con l'anticorpo anti emoglobina umana A0 (Hb A0) adeso alle particelle al lattice di polistirene. La variazione ottica prodotta dall'agglutinazione conseguente alla reazione antigene-anticorpo determina un'assorbanza proporzionale alla concentrazione di HbA0 nel campione nella sua fase lineare fino al limite di 1000 ng/mL. Il cut-off stabilito è pari a 100 ng/mL, pertanto tutti i campioni con un valore compreso tra 0 e 99 ng/mL sono stati refertati come negativi. Tale valore soglia è stato scelto in base alla letteratura che ha evidenziato scarsi vantaggi nell'abbassare ulteriormente la concentrazione [1]

L'esame preliminare dei dati si riferisce ai 7115 pazienti che hanno aderito allo screening sui 21585 reclutati nei centri principali. La positività al test è risultata del 6% circa con un totale di 450 positivi. Si è constatato che il valore discriminante di 100 ng/mL da noi utilizzato è giustificato dal fatto che in oltre l'80% dei casi era riscontrabile, alla colonscopia, una patologia significativa di intervento terapeutico.

Una riflessione andrà fatta anche sull'adesione relativamente bassa (circa il 65%) all'accettazione di sottoporsi alla colonscopia, legata a fattori psicologici e/o educazionali.

Bibliografia

Relazione tra il valore di cut-off ed il cancro del colon - Significato della trasformazione in valori numerici (dati del centro sanitario di Asahikawa)

193

LA VITAMINA B12-ATTIVA QUALE PARAMETRO DIAGNOSTICO AGGIUNTIVO PER LA DEMENZA (DOSAGGIO MEIA B12-ATTIVA, AXIS-SHIELD, SU ANALIZZATORE AUTOMATICO AXSYM, ABBOTT)

C. Novembrino¹, S. Lonati², R. De Giuseppe², V. Uva², E. Scarpini¹, I. Guidi¹, D. Galimberti¹, E. Torresani³, R. Maiavacca³, F. Bamonti²

¹Dipartimento di Scienze Neurologiche, Centro "Dino Ferrari", Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano

²Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano

³Laboratorio Patologia Clinica, Dipartimento Area Servizi Diagnostici, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano

La carenza di Vitamina B12 (B12) ha conseguenze cliniche quali anemia megaloblastica e patologie neurodegenerative e può comportare iperomocisteinemia (HHcy) e conseguenti disturbi cardiovascolari, difetti fetali, disordini neuropsichiatrici e demenza. Una diagnosi precoce del deficit di B12 è pertanto cruciale. Recenti studi hanno riportato che il dosaggio del complesso B12-Transcobalamina (B12-Attiva, B12-A), forma biologicamente attiva, è utile a scopo preventivo su soggetti asintomatici.

Lo studio prevede di verificare nella demenza l'utilità diagnostica del dosaggio dei livelli sierici di B12-A per meglio inquadrare un deficit di B12.

In pazienti con malattia di Alzheimer (48 AD) e demenza vascolare (10 VaD), in soggetti con Mild Cognitive Impairment (27 MCI) ed in 28 controlli erano determinati livelli di B12 (siero), folato (siero ed eritrociti), omocisteina totale (tHcy, plasma) su analizzatore automatizzato AxSYM (Abbott); i livelli di B12-A erano valutati tramite il nuovo dosaggio MEIA AxSYM B12-Attiva (Abbott). I dati sono espressi in tabella come mediana (IQR). A conferma di un nostro studio, HHcy era presente nella metà circa dei casi.

La B12-A mostrava una debole correlazione positiva con la B12 totale sia in tutti i gruppi sia nei controlli. Ad eccezione dei VaD, un terzo circa dei casi aveva livelli di B12-A al di sotto del cut off, indicando un latente deficit di vitamina non riscontrabile dai livelli di B12 totale. I dati sembrano confermare l'utilità del dosaggio della B12-A a scopo preventivo-diagnostico in soggetti a rischio di sviluppare demenza con conseguente danno neurologico irreversibile.

Bibliografia

I. Guidi et al. *Neurobiol Aging* 2006;27:262-9

194

DETERMINAZIONE DEI ROMS E DEI GRUPPI TIOLICI PLASMATICI (SH) IN UN GRUPPO DI PAZIENTI CRITICI RICOVERATI IN RIANIMAZIONE

C. Rossi¹, A. Minucci¹, S. Persichilli¹, L. Montini², M. Calabrese², J. Gervasoni¹, F. Iavarone¹, B. Zappacosta¹, P. De Sole¹

¹Ist. di Biochimica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Ist. di Anestesiologia e Rianimazione, Università del Sacro Cuore, Roma

Scopo. La determinazione delle specie reattive dell'ossigeno e dei suoi metaboliti (ROMs) è proposta da più autori come valido strumento diagnostico atto a valutare l'intensità del danno tissutale di tipo ossidativo (1). Inoltre, la misura dei gruppi tiolici liberi (SH) plasmatici insieme a quella dei ROMs può fornire una indicazione dell'equilibrio tra insulto ossidante e capacità antiossidante. Nel presente lavoro riportiamo le misure di ROMs ed SH in pazienti della rianimazione divisi in tre gruppi a seconda della gravità delle loro condizioni con lo scopo di evidenziare eventuali correlazioni dei parametri analizzati con la situazione clinica.

Materiale. Pazienti: 60 pazienti ricoverati in rianimazione suddivisi in 3 gruppi (sepsi, sepsi grave, shock settico), ca. 3 determinazioni per paziente in 2-3 settimane.

Controlli: 20 pazienti chirurgici non complicati, prelievi nelle 24 h post-operatorio, 60 donatori sani.

Metodi. I ROMs e gli SH plasmatici sono stati determinati con Kit in commercio (DIACRON -Italia).

Risultati. I valori di SH plasmatici dei pazienti non mostrano differenze rispetto a quelli dei controlli. I ROMs. in aggiunta ad un significativo aumento nei pazienti rispetto ai controlli (ca. 20-30%), mostrano un netto aumento della variabilità degli stessi, (CV 50-60% nei gruppi di pazienti contro 20% nei controlli).

Conclusioni. I risultati ottenuti permettono le seguenti conclusioni:

- 1) la determinazione dei ROMs non sembra essere correlata con la gravità delle condizioni cliniche dei pazienti analizzati;
- 2) gli elevati valori dei CV riscontrati nei tre gruppi di pazienti analizzati, a differenza di quanto ottenuto nei gruppi di controllo, potrebbero essere indicativi di una relazione tra ROMs e condizione clinica più complessa di quanto finora ipotizzato.

Bibliografia

1. Bergamini C.M. et al, *Current pharmaceutical design*, 2004;10:1611-1626.

195

FACTOR V G1691A, PROTHROMBIN G20210A AND MTHFR A1298C GENE POLYMORPHISM IN SUBJECTS AFFECTED BY THROMBOEMBOLIC DISEASE

C. Scazzone¹, A. Caruso¹, E. Lio¹, B. Lo Sasso¹, G. Mingioia¹, S. Cammarieri¹, G. Chiarello¹, A. Bono², M. Ciaccio¹

¹*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

²*Cattedra di Chimica Medica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

Introduction. Thromboembolic disease is the result of multiple interactions between non-genetic and genetic risk factors. Among the inherited as a risk factors are single nucleotide polymorphism (SNPs) in the genes coding for blood coagulation factors which induce either the synthesis of a defective protein, or the enhanced production of a procoagulant protein.

Factor V G1691A, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) A1298C mutations are considered risk factors for thromboembolic disease (1).

Materials and Methods. The aim our study was to determine the prevalence of single SNP in 107 patients with thromboembolic disease and in 35 control subjects.

Total genomic DNA was extracted from whole human blood by salting-out procedure. DNA samples were amplified by a polymerase chain reaction (PCR) and the detection of the polymorphisms were investigated by the restriction fragment length polymorphism (RFLP). The restriction fragments were separated by electrophoresis agarose gel.

Results. For the factor V G1691A polymorphism, the genotype frequencies of the patients with thromboembolic disease were 88% GG and 12% GA, while in control subjects they were 100% GG.

The distribution of the prothrombin G20210A genotypes was 93.6% GG and 6.4% GA in patients with thromboembolic disease and was 100% GG in control subjects.

The frequencies of the MTHFR 1298 CC, AC, and AA genotypes in patients group were 14.8%, 46.6%, and 38.6%, respectively, and were not significantly different from those in control subjects (9.8%, 48.4%, and 41.8%, respectively).

Discussion. Our results indicate that the frequency of the MTHFR A1298C polymorphism was similar between the patients with thromboembolic disease and the control groups. While, our data suggest that higher frequency of the G/A FV-Leiden and PRT G20210A genotypes in the patients than control group, could represent important risk factors for thromboembolic disease. However, additional studies are required to confirm our findings.

References

1. WY Almawi et al. J Thromb Thrombolysis, 2005;19:189-196.

196

GERD PATIENTS: A RISK GROUP FOR XEROSTOMIA AND ORAL LESIONS? A CASE CONTROL STUDY

D. Butera¹, O. Di Fede², G. Campisi², C. Scazzone¹, A. Caruso¹, E. Guglielmini¹, G. Bivona¹, C. Bellia¹, M. Ciaccio¹

¹*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

²*Dipartimento di Scienze Stomatologiche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

Objective. To evaluate quantitative and/or qualitative alterations in salivary secretion in gastroesophageal reflux disease (GERD) patients and to assess the frequency of GERD related lesions (1).

Patients and methods. 120 patients with endoscopically documented GERD were recruited (males 48.3%, mean age: 31±12) and compared with 98 healthy controls; all of them underwent to oral examination in order to perform quantitative salivary tests and to search oral GERD-related lesions including: xerostomia, halitosis and acid/burning sensation. Only stimulated collection was analyzed for [K+] and [Na+] by spectrophotometer, and for pH value by digital pHmeter; SPSS 10.5 software was used for statistical analysis.

Result. Frequency of oral lesions was significantly higher in GERD patients than in control group (xerostomia: 54.4% vs 28.6%; halitosis: 49.2% vs 30.6% and acid/burning sensation: 43.3% vs 21.4%). Similarly, pH value, [K+] and [Na+] were significantly higher in GERD patients than in controls.

Conclusions. GERD patients were found to have a specific target in terms of salivary functions and pH. Strictly related to this, it seems the significant risk exposure of GERD patients to erosive lesions, xerostomia, burning sensation and halitosis.

Reference

1. KC Leung et al. Int Dent J, 2004; 54: 159-165.

197

POTENTIAL ROLE OF VITAMIN K2 PLASMA LEVELS DETERMINATION IN ALZHEIMER'S DISEASE

E. Guglielmini¹, D. Butera¹, F. Asaro¹, G. Di Salvo¹, N. Oliveri¹, C. Scazzone¹, A. Bono², R. M. Camarda³, M. Ciaccio¹

¹*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

²*Cattedra di Chimica Medica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

³*Cattedra di Neurologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

Introduction. Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly. The incidence of AD increases with age and in subjects carrying ApoE4 genotype. A deficiency of vitamin K, which affects the extrahepatic functions of the vitamin, is common in elderly, both men and women. Several evidences suggest that vitamin K has important functions in the brain, including the regulation of sulfotransferase activity of a growth factor/tyrosine kinase receptor (1). While the predominant form in the liver is vitamin K1, in some organs, such as the brain, the most abundant form of this vitamin is the K2 one. Therefore, it is reasonable to hypothesize that low plasma levels of vitamin K2 may increase the risk of developing AD.

Materials and methods. To elucidate the possible role of vitamin K in the pathogenesis of AD, we assessed plasma levels of vitamin K2 by high-performance liquid chromatography (HPLC) in a population sample made of 29 patients with AD. As control group, we selected 50 age- and sex-matched healthy subjects.

Results. The mean plasma level of vitamin K2 was lower in subjects with AD than in control group (150 vs 340 µg/L).

Conclusion. Our result shows that AD subjects present lower vitamin K2 plasma levels than healthy controls; this finding support the hypothesis that vitamin K2 deficiency may contribute to the pathogenesis of AD, so screening elderly population for vitamin K2 level may be beneficial in the prevention of AD.

References

1. A.C. Alison. *Med Hypotheses*, 2001;57:151-154.

198

VITAMIN E AND ENDURANCE EXERCISE

E. Guglielmini¹, D. Butera¹, F. Asaro¹, G. Di Salvo¹, N. Oliveri¹, A. Bono², M. Ciaccio¹

¹*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

²*Cattedra di Chimica Medica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

Introduction. It has been demonstrated that endurance exercise increases the production of Reactive Oxygen Species (ROS) to a point that they exceed antioxidant defenses causing oxidative stress (1). Moreover, it seems that strenuous endurance exercise may enhance the oxidation of low density lipoprotein (ox-LDL), which plays a key role in the initiation and progression of atherosclerosis. Recent studies suggest that vitamin E may play an important role in preventing the free radical damage associated with endurance exercise, such as lipid peroxidation. The aim of our study was to examine plasma levels of vitamin E in a group of exercise-trained athletes.

Materials and Methods. Plasma levels of vitamin E were examined in 20 exercise-trained athletes and 20 age- and sex-matched sedentary controls. Dietary intakes of antioxidants were also similar between the two study groups. Vitamin E concentrations were determined by established simultaneous liquid chromatography procedures.

Results. Plasma levels of vitamin E were higher in athletes compared with sedentary controls (25 mg/L vs 10 mg/L).

Conclusion. According to our data, endurance trained athletes have higher vitamin E plasma levels in comparison with sedentary controls; this result can be explained as an adaptive response to the increased ROS production typically observed after physical exercise.

References

1. TA Watson et al. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2005;15:131-146.

199

STRATIFICAZIONE PROGNOSTICA DELL'EMBOLIA POLMONARE: CORRELAZIONE TRA BIOMARKERS, ECOCARDIOGRAFIA TRANSTORACICA ED ANGIO TC SPIRALE

F. Antonelli¹, L. Masotti², E. Venturini¹, G. Landini², L. Villani¹

¹U.O. Lab analisi chimico clinico e microbiologiche Osp. Cecina, Livorno

²U.O. Medicina interna Osp. Cecina, Livorno

³U.O. Cardiologia Osp. Cecina, Livorno

Premesse. La Tromboembolia polmonare (EP) può determinare disfunzione cardiaca dx evidenziabile mediante ecocardiografia transtoracica (ETT). E' comunque ormai affermato in letteratura che indici indiretti di disfunzione cardiaca dx possono essere considerati la troponina I (cTI) ed il p-BNP, che hanno anche ruolo predittivo negativo.

Scopo dello studio. Valutare la relazione tra biomarkers di disfunzione cardiaca dx, di attivazione della coagulazione e di fase acuta dell'infiammazione con sede del trombo nel circolo polmonare angioTC evidenziato ed impegno emodinamico ecocardiografico in pz ricoverati per EP.

Materiali e metodi. Abbiamo analizzato retrospettivamente i dati angioTc polmonare spirale, di laboratorio ed ecocardiografici di 60 pz, 31 F e 29 M, di età media \pm DS 72.1 ± 13.7 anni (range 34-98), ricoverati nel nostro Ospedale negli ultimi 3 anni (2004-2007) con diagnosi di EP. Abbiamo utilizzato come indicatore plasmatico di disfunzione cardiaca dx la cTI (Beckman), come indicatore di coagulazione attivata il D-Dimero (BioMerieux), di infiammazione il Fibrinogeno (Dade) e la proteina C reattiva (PCR, Roche). Come indicatori d'impegno cardiaco dx abbiamo analizzato i dati ETT relativi al rapporto ventricolo dx/ventricolo sx (VDX/VSIN) e della pressione arteriosa polmonare sistolica stimata sulla tricuspide (PAPs).

Risultati. Il 40% dei pz ha presentato una EP unilaterale, il 60% bilaterale. I valori medi della Troponina I e del D-Dimero sono risultati incrementare progressivamente con l'aumento dell'impegno emodinamico cardiaco dx e del progressivo impegno prossimale e bilaterale del trombo polmonare, mentre non è stata rilevata questa correlazione per fibrinogeno e PCR.

Conclusioni. Il nostro studio evidenzia che l'impegno cardiaco dx nei pz con EP correla con l'entità prossimale e bilaterale del coinvolgimento trombotico arterioso polmonare. Il dosaggio di cTI e D-Dimero correla con i dati ecocardiografici e tomografici. Quindi il dosaggio di questi biomarkers potrebbe essere utile, già in condizioni di urgenza, per stratificare la severità dell'EP in fase acuta, fornendo importanti informazioni per le opzioni terapeutiche.

200

EFFETTO DEL MERCURIO DA AMALGAMA DENTARIA SULL'OMOCISTEINEMIA

F. Bamonti¹, C. Novembrino², S. Lonati¹, V. Uva¹, R. De Giuseppe¹, G. Defilippi¹, G. Guzzi³

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano

²Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano

³Associazione Italiana Ricerca Metalli e Biocompatibilità - A.I.R.M.E.B., Milano

L'amalgama dentaria è la principale fonte di vapori di mercurio (Hg) cui è esposta la maggioranza della popolazione, con il rischio di diffusione del metallo nei tessuti tramite torrente circolatorio. La rimozione di tali amalgami può portare anch'essa ad un aumento delle concentrazioni ematiche di Hg incrementando il rischio di eventi avversi a diversi organi (cuore, rene, cervello)(1). L'iperomocisteinemia (HHcy) è un fattore di rischio indipendente per patologie cardiovascolari.

Negli ultimi anni è stata ipotizzata un'interferenza da parte di Hg sul metabolismo dell'omocisteina (Hcy), ma non sono ancora stati effettuati trials clinici a proposito.

Scopo del nostro studio è stato pertanto quello di verificare l'esistenza di una relazione fra l'esposizione a Hg presente nell'amalgama dentaria e le concentrazioni plasmatiche di omocisteina.

Sono stati analizzati 113 soggetti così suddivisi: gruppo A (senza amalgama; 2M/8F, età 24.7 ± 5.6 anni); gruppo B (amalgama con Hg; 13M/38F, età 43.6 ± 12.3 anni); gruppo C (dopo rimozione amalgama 8M/20F, età 50.1 ± 10.8 anni); gruppo D (restauri con altri metalli 4M/20F, età 58.2 ± 11.8 anni). Le concentrazioni plasmatiche di Hcy sono state misurate tramite metodica HPLC con detector fluorimetrico (Waters). L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test t-Student.

I livelli di Hcy (media \pm DS) nei 4 gruppi erano: A 8.6 ± 2.4 , B 10.6 ± 6 , C 13.1 ± 7.4 , D 9.9 ± 4.01 microM (A vs C $p < 0.05$). Inoltre, HHcy (> 10 microM) era presente nel 20% A, 34% B, 44% C e 29% D.

I nostri dati indicano che la procedura di rimozione dell'amalgama, più che l'esposizione a Hg in essa contenuto, può indurre un aumento dei livelli di Hcy, con HHcy di grado moderato nella metà circa dei casi. Il meccanismo alla base di questa osservazione non è ancora del tutto chiaro, ma è possibile ipotizzare che il trasporto renale di Hcy e Hg sia correlato e che gli ioni Hg determinino un danno a livello del rene causando HHcy. Ulteriori studi sono necessari per confermare i dati preliminari e chiarire le nostre ipotesi.

Bibliografia

1. Guzzi G. et al, Am J Forensic Med Pathol 2006;27:42-5

201

MULTI-CENTER EVALUATION OF A NEW HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg) ASSAY ON THE FAMILY OF ACCESS IMMUNOASSAY SYSTEMSF. Bouniort¹¹*Beckman Coulter Eurocenter, Nyon, Switzerland*

Background. Accurate detection of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) is an important goal for the diagnosis of patients infected with hepatitis B virus (HBV). A multi-center study characterized the clinical performance of the new Access HBsAg and HBsAg Confirmatory assays based on paramagnetic particle, solid phase technology and chemiluminescent signal detection.

Methods. Relative specificity was calculated from 5,020 blood donors from two blood donation centers and 566 subjects from a University Hospital. Relative sensitivity was calculated from 290 subjects with a diagnosis of acute or chronic HBV infection. Percent negative and positive agreements were calculated relative to the Abbott PRISM and Abbott AxSYM immunoassay systems.

Results. Negative percent agreement for the Access HBsAg assay in a blood donor population was 99.96% (5018/5020). Negative percent agreement for the Access HBsAg assay at the University Hospital was 99.65% (564/566). Discrepant samples were not confirmed with the Access HBsAg Confirmatory assay and agreement between methods after confirmatory testing was 100%. Positive percent agreement for subjects with known HBV infection in the Access HBsAg assay was 100% (290/290). All positive samples were confirmed in the Access HBsAg Confirmatory assay. Excellent separation of positive and negative populations was observed.

Conclusion. The Access HBsAg and Access HBsAg Confirmatory assays provide excellent sensitivity and specificity for the detection of HBsAg in hospital and blood donor populations with the advantage of a rapid, automated, random-access immunoassay system.

202

EFFECT OF REHABILITATION PROGRAM ON CIRCULATING ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS AND INFLAMMATION IN PATIENTS UNDERGOING CARDIAC SURGERYF. Cesari¹, R. Caporale², A. Capalbo¹, R. Marcucci¹, A. Gori¹, C. Macchi³, M. Vannucci⁴, T. Cellai⁴, G. Messeri², R. Abbate¹, G. Gensini¹¹*Department of Medical and Surgical Critical Care, Thrombosis Centre, University Of Florence, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence*²*Central Laboratory, Azienda-Ospedaliera Universitaria Careggi, Florence*³*Don Carlo Gnocchi Foundation Onlus, IRCCS, Impruneta, Florence*⁴*Unit of Cardiac Rehabilitation I.F.C.A. "Ulivella e Glicini", Florence*

Introduction. Endothelial progenitor cells (EPCs) are bone marrow-derived progenitor cells which are involved in supporting vascular endothelium, so playing a crucial role in the beginning and progression of atherosclerosis. It was previously demonstrated that a potent trigger for EPCs mobilization is regular physical exercise but no data are available regarding the effect of a rehabilitation program after cardiac surgery on EPCs in patients who underwent cardiac surgery.

Aim. We performed this study in order to assess the variations of EPCs in relation to inflammatory markers in patients who performed a 15 day-rehabilitation program after cardiac surgery.

Methods. In 92 cardiac surgery patients [56 M/36 F; 72.5 (47-88) yrs] the numbers of EPCs and the serum levels of IL6, IL8, IL10, IL1Ra, VEGF and high sensitivity CRP were determined pre-surgery (T1), at the beginning (T2) and at the end (T3) of the rehabilitation program. Peripheral blood EPCs were measured by using flow cytometric and were defined as CD34+KDR+, CD133+KDR+ and CD34+CD133+KDR+. Cytokines were determined using a multiplex bead-based assay and CRP by nephelometric method.

Results. With regards to EPCs, we observed a decrease at T2 in both groups, while at T3, EPCs increase with respect to T2 [CD34+KDR+: 0.0030 (0-0.025)% vs 0.0035 (0 -0.080)%; CD133+KDR+: 0.0030 (0-0.014)% vs 0.0035 (0-0.0175)% p<0.01; CD34+CD133+KDR+: 0.0020 (0-0.0240)% vs 0.0025 (0-0.065)%]. Concerning inflammation, IL6, IL8, IL10, VEGF, IL1Ra and hsCRP levels significantly increased at T2 and then decreased at T3 without reaching T1 values.

Conclusions. A 15-day rehabilitation program after cardiac surgery is able to determine an increase in EPCs' number with the contemporary decrease of inflammatory markers. These results can suggest a mechanism of physical exercise in determining revascularization process after cardiac surgery.

203

RETICULATED PLATELETS INFLUENCE PLATELET FUNCTION IN HIGH RISK PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE ON ANTIPLATELET THERAPY

F. Cesari¹, A. Gori¹, R. Marcucci¹, R. Paniccia¹, E. Antonucci¹, R. Caporale², A. Fanelli², G. Messeri², G. Gensini¹, R. Abbate¹

¹Department of Medical and Surgical Critical Care, Thrombosis Centre, University of Florence; Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence

²Central Laboratory, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence

Introduction. Over the last years, an increasing interest on the phenomenon of the residual platelet reactivity (RPR) on coronary artery disease (CAD) patients under antiplatelet therapy has been evidenced. The unpredictable response to antiplatelet therapy can be attributed to clinical, pharmacogenetic and cellular factors. Reticulated platelets (RP) are immature platelets that reflect platelet production from megakaryocytes so contributing to the rate of platelet turnover. A high platelet turnover rate could produce a population of platelets that could confer RPR through several different mechanisms.

Aim. To assess the influence of RP on RPR in CAD patients on antiplatelet therapy

Methods. In 442 consecutive CAD patients undergoing percutaneous coronary intervention on antiplatelet therapy we measured RP by using the Sysmex XE-2100 haematology analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). RP were expressed as the percentage of RP of the total optical platelet count (immature platelet fraction; IPF), as the absolute number of RP/l (IPF#), and as the percentage of RP highly fluorescent (H-IPF). Platelet function was assessed by optical aggregometry (PA) on platelet-rich-plasma induced by 1 mmol arachidonic acid (AA-PA) and 10 micromol/L ADP (ADP-PA). RPR was defined as either AA-PA >20% or ADP-PA >70%.

Results. A significant difference for IPF and H-IPF between patients with and without RPR was observed [AA-PA >20% IPF 4.4 (1.3-16.4) vs 3.8 (1.2-11.3) % $p < 0.005$; H-IPF 1.3 (0.3-7.6) vs 1.1 (0.3-8.0) % $p = 0.007$; ADP-PA >70% IPF 4.1 (1.3-16.4) vs 3.9 (1.2-13.7) % $p < 0.05$; H-IPF 1.3 (0.3-7.6) vs 1.1 (0.3-8.0) % $p < 0.05$]. By dividing the patients according to tertiles of PA, a significant trend for an increase of IPF and H-IPF was evidenced (ADP-PA $p < 0.005$, $p < 0.005$ respectively; AA-PA $p < 0.005$, $p = 0.008$ respectively).

Moreover, significant correlations between PA, IPF and H-IPF were found [ADP-PA and IPF $r = 0.19$, $p < 0.0001$; ADP-PA and H-IPF $r = 0.19$, $p < 0.0001$; AA-PA and IPF $r = 0.15$, $p = 0.001$; AA-PA and H-IPF $r = 0.16$, $p = 0.001$].

Conclusions. This study indicates that a high rate of platelet turnover, as suggested by the presence of RP, is a new mechanism which plays a role in determining RPR in high risk CAD patients.

204

VALUTAZIONE DEI MARCATORI BIOCHIMICI DI RIMODELLAMENTO OSSEO IN PAZIENTI CON MORBO CELIACO

F. Pagani¹, G. Bonetti¹, L. Piccioni¹, F. Lanzarotto²

¹U.O. Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, A.O. Spedali Civili, Brescia

²U.D. Gastroenterologia, A.O. Spedali Civili, Brescia

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 formazione ossea (fosfatasi alcalina ossea, BALP; osteocalcina, OC; propeptide N-terminale del procollagene di tipo I, PINP) e di riassorbimento osseo (desossipiridinolina urinaria libera, U-DPD; telopeptide N-terminale del collagene I urinario, U-NTX-I). Il gruppo studiato era composto da 38 pazienti celiaci adulti in cui la diagnosi era confermata mediante biopsia intestinale, 11 maschi (età 19-55 anni) e 27 femmine (età 15-64 anni).

I valori medi (intervallo) per i cinque marcatori erano i seguenti: BALP 43 U/L (10-119); OC 40 $\mu\text{g/L}$ (14-95); PINP 76 $\mu\text{g/L}$ (11-196); U-DPD 6.9 $\mu\text{M/Mcrea}$ (2.7-16.7); U-NTX-I 64 $\mu\text{M BCE/Mcrea}$ (8-155). Valori elevati di BALP (>50 U/L) si evidenziavano nel 24% dei pazienti, di OC (>32 $\mu\text{g/L}$) nel 66%, di PINP (>58 $\mu\text{g/L}$) nel 63%, di U-DPD (maschi >5.3, femmine >7.0 $\mu\text{M/Mcrea}$) nel 47%, di U-NTX-I (>70 $\mu\text{M BCE/Mcrea}$) nel 29%. In 17 pazienti l'aumento dei marcatori di formazione era associato ad un aumento dei marcatori di riassorbimento, mentre in 12 (41%) si evidenziava solamente un incremento della formazione o un incremento del riassorbimento. Le correlazioni tra i marcatori di formazione ossea portavano ai seguenti risultati: PINP vs BALP $r = 0.629$; PINP vs OC $r = 0.916$. La correlazione tra i due marcatori di riassorbimento osseo U-NTX-I e U-DPD portava ad un coefficiente $r = 0.720$. Correlando un marcatore di osteoformazione con un marcatore di riassorbimento si ottenevano i seguenti coefficienti di correlazione: BALP vs U-DPD e vs U-NTX-I, $r = 0.447$ e $r = 0.621$; OC vs U-DPD e vs U-NTX-I, $r = 0.570$ e $r = 0.814$; PINP vs U-DPD e vs U-NTX-I, $r = 0.555$ e $r = 0.788$, rispettivamente. I dati ricavati dalla valutazione di questo gruppo di pazienti confermano la necessità di eseguire sempre associati un marcatore di formazione ed uno di riassorbimento. I risultati relativi alle correlazioni indicano la possibilità che i vari marcatori biochimici, seppur indicativi nel loro complesso di alterazioni del rimodellamento, riflettano aspetti fisiopatologici diversi nell'ambito del metabolismo osseo.

205

NON-ORGAN-SPECIFIC AUTOANTIBODIES (NOSAs) AND CMV INFECTION IN RENAL TRANSPLANT

F. Sidoti¹, C. Costa¹, M. Bergallo¹, G. A. Touscoz², M. E. Terlizzi¹, S. Astegiano¹, R. Vendrame¹, F. Forgnone¹, R. Cavallo¹

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

²S.C.D.U. Gastrohepatology, Laboratory of Digestive and Hepatic Pathophysiology, Molinette Hospital, Turin Italy

Introduction. A relation between CMV infection and development of NOSAs has been reported in several studies, hypothesizing a role in the onset of rejection in transplant recipients [1]. Aim of this study was to evaluate the presence of NOSAs in sera from kidney transplant recipients, to correlate it with CMV infection, and with the onset of acute or chronic rejection.

Methods. Presence of NOSAs (anti-nuclear [ANA], anti-smooth muscle [SMA], anti-mitochondrial [AMA], and anti-liver-kidney microsomal [LKM] antibodies) was evaluated in 132 sera from 59 renal transplant pts by indirect immunofluorescence (IIF). CMV infection was evaluated by pp65-antigenemia test.

Results. pp65- antigenemia was positive in 27 of 59 (45.8%). NOSAs were detected in 15 of 59 (25.4%) pts: 8 of 32 (25%) pp65-antigenaemia-negative pts and 7 of 27 (25.9%) positive pts. Before transplantation, 6 out of 59 (10.2%) pts were positive to autoantibodies: 3 to ANA, 1 to SMA, 1 to both ANA and SMA, and 1 to LKM-1. None of the pts was positive to AMA. During the follow-up post-transplantation, 9 of the 53 (17%) pts who were NOSAnegative before transplantation became positive: 8 to ANA, 1 to SMA. Of these 9 pts, 3 were pp65-antigenaemianegative and 6 positive. NOSAs persisted in the 6 pts who were positive before transplantation. None of the pts resulted positive to AMA. No significant difference regarding the presence of NOSAs was found between pp65-antigenaemia positive and negative pts. Acute rejection developed in 8/59 pts: 4 of 27 (14.8%) pp65-positive vs 4 of 32 (12.5%) pp65-negative pts ($p = n.s.$) and 4 of 15 (26.7%) NOSA-positive vs 4 of 44 (9.1%) NOSA-negative pts ($p = n.s.$). None presented chronic rejection.

Conclusions. It doesn't seem to exist a relation between CMV infection, NOSAs and acute rejection in renal transplant recipients. Nevertheless, the development of acute rejection tended to be more frequent in NOSA-positive patients. In view of the finding of this study and the small number of patients examined, no definitive conclusion could be drawn and the correlation between NOSA appearance and development of rejection cannot be ruled out.

References

1. Varani et al. J Med Virol 2002;66:56-62.

206

CHANGES IN SERUM FETUIN-A AND INFLAMMATORY MARKERS LEVELS IN END STAGE RENAL DISEASE (ESRD): EFFECT OF A SINGLE SESSION HAEMODIALYSIS

G. Bivona¹, C. Bellia¹, C. Scazzone¹, G. Scardaci¹, G. Mingoia¹, E. Di Natale², R. Iatrino², M. Li Vecchi², M. Ciaccio¹

¹Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

²Cattedra di Nefrologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

Background. Vascular calcification is common in end-stage renal disease (ESRD) and it is a central characteristic of accelerated atherogenesis in these patients (1); since inflammation represents a non-traditional risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease (CVD), frequently observed in haemodialysis (HD) patients (1), both inflammation and vascular calcification seem to contribute to the cardiovascular mortality in HD patients. α 2-Heremans-Schmid glycoprotein (AHSG), also known as Fetuin-A, is an endogenous inhibitor of vascular calcification, negatively related to inflammation. In the present study, we examined the effect of a single HD session on serum fetuin-A levels and other markers of inflammation, such as C-reactive protein (CRP), fibrinogen and albumin.

Methods. 46 patients (60% male), with a mean age of 65 ± 14 years, subjected to a standard bicarbonate-HD treatment were recruited. Blood samples were taken at the start and at the end of a 4-h dialysis session and serum fetuin-A concentrations were determined by a sandwich immunoenzymatic assay (ELISA) according to manufacturer's specifications (Epitope Diagnostics Inc.); albumin and CRP levels were determined by colorimetric and immunoturbidimetric method, respectively (ILab 300; Instrumentation Laboratory).

Results. After a single dialysis session serum fetuin-A levels significantly decreased (0.5 pre-HD vs 0.32 g/l post-HD) while albumin and fibrinogen levels rose (respectively 3.63 vs 3.83 g/dl and 413 vs 429 mg/dl); CRP didn't significantly change.

Conclusions. Our results clearly show that low serum fetuin-A levels are associated with inflammation in dialysis patients; since fetuin-A is an important circulating inhibitor of vascular calcification, its deficiency in HD patients provides a potential link to uremic vascular disease and mortality. HD-induced inflammation might contribute to low serum fetuin-A levels and mortality in ESRD.

References

1. Westenfeld R, Jahnke-Dechent W and Ketteler M. Vascular calcification and fetuin-a deficiency in chronic kidney disease. Trends Cardiovasc Med., 2007; 17(4): 124-128.

207

THE RISK OF CARDIOVASCULAR EVENTS IS REDUCED BY LOWERING HYPERHOMOCYSTEINEMIA SHORT TERM B VITAMINS THERAPY

G. Bivona¹, C. Bellia¹, C. Scazzone¹, S. Cammarieri¹, E. Lio¹, S. Siragusa², M. Ciaccio¹

¹*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

²*Cattedra di Ematologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*

Introduction. Hyperhomocysteinemia is associated with atherosclerosis, atherothrombosis and Venous ThromboEmbolism (VTE) (1). Long-term vitamin supplementation usually decreases plasma homocysteine levels, but it's not always useful to lowering the risk of recurrent cardiovascular events. Aim of our study was to evaluate short-term vitamin therapy effects on the risk of recurrent cardiovascular events.

Methods. Among 266 cardiovascular patients (70% male, aged 63 ± 6 years), 146 underwent short-term therapy (folate 5 mg, vitamin B6 250 mg and vitamin B12 500 mg twice a week for 3 months), while 120 received placebo; all of them were followed-up over a period of 2 years, for evaluating occurrence of primary outcomes, including symptomatic VTE, CAD, myocardial infarction and stroke. Homocysteine plasma levels were monitored every 3 months; plasma concentrations were determined with an immunoassay performed by AxSYM, Abbott Diagnostics. **Results.** After 3 months, the mean homocysteinemia levels were decreased ($5.2 \mu\text{mol}$) and this reduction was associated with lower rates of primary cardiovascular outcomes, compared with placebo (recurrent events and mortality during the 2 years of follow-up: 5% patients vs 23% placebo).

Conclusions. Short term B vitamin therapy is efficacious for reducing the risk of cardiovascular recurrent events.

References

1. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*, 2006;338:1042-1050.

208

UTILITA' DELLA PROCALCITONINA, DELLA PROTEINA C-REATTIVA E DELLA CONTA LEUCOCITARIA COME MARCATORI PRECOCI DI INFEZIONE BATTERICA CON INTERESSAMENTO SISTEMICO IN PAZIENTI PEDIATRICI

G. Cattozzo¹, D. Graziani², T. Barbieri¹, M. Marinoni¹, L. Nespoli², G. De Luca²

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

²*Università degli Studi dell'Insubria, Varese*

La procalcitonina (PCT) del siero è una proteina con sequenza amminoacidica identica a quella del proormone della calcitonina. Nel corso delle sepsi si osservano alte concentrazioni di PCT, mentre non si osserva aumento in caso di infezione batterica localizzata ad un organo o di infezioni virali. Scopo di questo lavoro è la valutazione dell'utilità diagnostica della PCT per riconoscere infezioni batteriche con interessamento sistemico in pazienti pediatrici con febbre insorta da meno di 12 ore. L'utilità della PCT è stata confrontata con quella della proteina C-reattiva (CRP) e della conta leucocitaria. Venivano reclutati 19 pazienti (età 1-112 mesi) con febbre insorta da meno di 12 ore. La concentrazione della PCT veniva misurata con metodo immunoluminometrico (reagenti Brahms, forniti da Dasit). Per la misura della CRP veniva utilizzato un metodo immunoturbidimetrico (Olympus); per la conta leucocitaria si utilizzava un contaglobuli automatico (Dasit). L'utilità clinica della PCT veniva valutata in termini di sensibilità e specificità diagnostica e di predittività del risultato negativo e del risultato positivo. Venivano inclusi nel gruppo campione i pazienti con sepsi o gravi infezioni batteriche accompagnate da compromissione dello stato generale; il gruppo di controllo comprendeva pazienti affetti da altre malattie infettive con eziologia batterica o virale. I risultati dimostrano che valori di PCT pari a $0,5 \mu\text{g/L}$ e $1,5 \mu\text{g/L}$ permettono di riconoscere, con differenti livelli di sensibilità e specificità diagnostica, infezioni batteriche con interessamento sistemico insorte nelle ultime 12 ore. L'elevato valore predittivo del risultato positivo (100 % per PCT superiore a $1,5 \mu\text{g/L}$) può rappresentare un riferimento per decidere in merito alla strategia terapeutica. Per i valori decisionali proposti ($0,5$ e $1,5 \mu\text{g/L}$) il valore predittivo del risultato negativo è inferiore a 100 %, quindi concentrazioni di PCT inferiori non escludono la presenza di infezione batterica. Determinazioni seriate di PCT non forniscono indicazioni prognostiche nelle 24 ore successive all'inizio di un'efficace terapia antibiotica. Livelli analoghi di utilità clinica sono stati riscontrati per la CRP, mentre per la conta leucocitaria si è constatata minore utilità.

209

ANEUPLOIDIE FETALI: DALL'INDAGINE CLINICA PRENATALE ALLA DIAGNOSI ANATOMO PATOLOGICAG. Magri¹, E. Baghino², G. Novaro³, C. Vignale³¹UOSe. "Sistemi di Certificazione e Qualità"²Lab. Analisi PO Imperia³UOSe. "Anatomia Patologica" di Imperia

Il sistema nervoso centrale rappresenta una delle sedi più frequenti di malformazioni congenite; tra le più comuni i difetti di chiusura del tubo neurale primitivo (stato disrafico). Abbiamo deciso di analizzare alcuni casi clinici particolari con un'attenta valutazione dei risultati ecografici e biochimici (ottenuti con l'Immulate 2000) ed elaborati con il Software PRISCA.

1) Caso clinico. Patologia rara; Gravidanza in donna di 36 anni; Biochimica: MoM AFP:7,72; rischio aumentato per DTN; Ecografia: interruzione della teca cranica; eseguito aborto terapeutico alla 18^{set}+6g.

Riscontro autoptico. Feto di sesso maschile, si osserva a livello delle ossa occipitali. erniazione delle meningi e di porzione dell'encefalo; all'apertura addominale si osservano: rene dx e sn con multiple cisti parenchimali; inoltre mancanza dell'antelice nell'orecchio destro.

Diagnosi. Feto con gonadi di sesso maschile, a morfologia della 13-14^{set} settimana, con encefalocele occipitale e con diffusa displasia renale multicistica. I reperti sono in accordo con la sindrome di Meckel-Gruber.

2) Caso Clinico. Falso negativo Biochimico; Età Anni 20. 1,età gestazionale 17^{set}+3g Biochimica: MoM AFP 0.93, rischio nella norma per DTN. Riscontro autoptico: "all'apertura della cavità cranica encefalo con ventricoli dilatati, contenente liquido sieroso limpido" Diagnosi: Malformazione intracranica (idrocefalo). Manca l'evidenza una MoM di AFP³2,5, un sottile tessuto non ha permesso il passaggio dell' AFP nel liquido amniotico che genera quindi il falso negativo

3) Caso Clinico. Falso positivo Ecografico; Età anni 30.7, età gestazionale 11^{set}+5g. TN 3.5mm CRL 51.8mm. Biochimica Ris. T21>1:50 Ris. Biochimico(senza TN)1:1122. Ris.T18>1:50. La positività del test è indotta da un valore elevato di translucenza nucale 3.5, peraltro riconfermata in una seconda ecografia. Il rischio biochimico con TN non è coerente con la letteratura perché non si possono avere contemporaneamente le positività per la 21 e la 18. La notevole variazione morfologica (non patologica) ha generato un abnorme aumento ecografico che ha trascinato alla positività anomala i risultati biochimici che da soli sarebbero rimasti negativi. Conclusioni Ridisputare le motivazioni dei FN e FP è un percorso per un miglioramento continuo.

210

METHIONINE SYNTHASE POLYMORPHISM A2756G AND ITS ASSOCIATION WITH THROMBOEMBOLIC DISEASEG. Mingoia¹, A. Caruso¹, S. Cammarieri¹, C. Scazzone¹, E. Lio¹, B. Lo Sasso¹, M. Ciaccio¹¹Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

Introduction. Methionine synthase (MTR) catalyzes the remethylation of homocysteine to methionine by simultaneous demethylation of 5-methyltetrahydrofolate to tetrahydrofolate in a reaction vitamin B12-dependent. Elevated plasma homocysteine (Hcy) levels have been associated with increased risk of cardiovascular disease. Hyperhomocysteinemia is caused by low intake of folate and other B vitamins, and by genetic factor including polymorphisms of genes encoding enzymes involved in Hcy remethylation.

In this study, we investigated the relationship between the MTR A2756G polymorphism and risk of thromboembolic disease (1).

Materials and Methods. We examined 88 individuals (age 24-76; ♀=43, ♂=45) who had experience a thromboembolic event and 32 control subjects (age 25-65; ♀=19, ♂=13).

Human genomic DNA was isolated from peripheral blood samples by salting-out procedure. MTR gene polymorphism was determined by polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The PCR amplification resulted in a fragment of 265 bp which was digested with the restriction enzyme HaeIII followed by electrophoresis in a 2% agarose gel. After restriction enzyme analysis the 2756A allele shows one fragment of 265 bp, while the 2756G allele results in two fragments of 180 and 85 bp.

Results. The frequencies of MTR polymorphism were 75%, 23.9%, 1.1% for AA, AG, GG genotype in cases and 56.2%, 34.4%, 9.4% in controls, respectively. Moreover, the prevalence of the G-allele in patients was lower than in controls, suggesting a protective role of this allelic variant. Discussion. These data suggest that MTR A2756G polymorphism is involved in affecting cardiovascular risk. This effect may be due to a higher activity of methionine synthase, which in turn give rise to a lower circulating levels of homocysteine. Our study supports the hypothesis that MTR GG genotype protects against thromboembolic events. However, further studies including a larger sample are required to confirm this result.

References

1. Z. Yates and M. Lucock. Haematol, 2002;87:751-756.

211

PREDICTIVE VALUE OF hCRP FOR RECURRENCE IN PATIENTS WITH PERSISTENT ATRIAL FIBRILLATION UNDERGOING CARDIOVERSIONG. V. Melzi d'Eril¹, A. Barassi¹, F. Tundo¹, G. Merlini², F. Lombardi¹¹Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano, Milano²Lab. di Biotecnologie, IRCCS S. Matteo e Università degli Studi di Pavia, Pavia

Several reports have shown that there is a mechanistic link between inflammatory processes and development of atrial fibrillation (Circulation 1997;96:3157-63). Aim of this study was to evaluate the effects of cardioversion (CV) on hCRP level in patients with persistent atrial fibrillation (AF) and preserved left ventricular ejection and to assess its correlation with early recurrence arrhythmia (ERA). We enrolled 53 consecutive patients (70% M; mean age 67 ± 7 y) with persistent AF, preserved ventricular function (VEF >45%), indication and consent for electrical CV and without signs of acute or chronic inflammatory diseases. Before CV (T-0), the patients underwent trans-thoracic and trans-esophageal echocardiography and blood sample collection for hCRP measurement that was repeated after 3 weeks (T-3). Recurrence within this time frame was considered as ERA. We measured hCRP with a nephelometric assay (BNII, Dade Behring); the reference values were <2.9 mg/L. Data are presented as median and interquartile range (IQR). Correlation between variables was calculated with Pearson's and Spearman's coefficients. No differences were observed in values before and after successful CV either for patients maintaining sinus rhythm (median 1.96 mg/L, IQR 0.6-3.0 mg/L vs 1.9 mg/L, IQR 1.0-2.9 mg/L; $p=0.31$) or in those with ERA (median 3.7 mg/L, IQR 2.2-5.9 mg/L vs: 3.35 mg/L, IQR 1.6-7.1 mg/L; $p=0.25$). At T-0, hCRP values were significantly higher in patients with ERA than in patients with maintained sinus rhythm (median 1.96 mg/L, IQR 0.6-3.0 mg/L vs 3.70 mg/L, IQR 2.2-5.9 mg/L; $p=0.014$). When considering the variable as dichotomic, splitting hCRP levels at T-0 by cut-off value (2.9 mg/L), we confirmed the difference between the two groups ($p=0.027$). A hCRP level ≥ 3.0 mg/L, in this population, presented a positive and negative predictive value for EAR of 58% and 78%, respectively. The percentage of EAR was respectively 12%, 25%, 33% and 71% in the four quartiles of hCRP distribution. The ROC curve for hCPR and EAR gives an optimal cut-off value of 3.6 mg/L (AUC: 0.76), obtaining a positive and negative predictive value of 64% and 81%, respectively. In conclusion, this study demonstrate that higher hCRP values before CV are predictive of EAR

212

INDICI DI INSULINO RESISTENZA IN LAVORATORI OBESIL. Vigna², L. Manenti¹, D. Sommaruga³, E. Torresani¹, L. Riboldi², A. S. Tirelli¹¹Lab. di Biochimica Clinica, IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano²U.O. Medicina del Lavoro I, IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano³Direzione Sanitaria Servizio Dietetico, IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano

L'obesità comporta come effetto a cascata ipertensione e diabete di tipo II preceduti da stato infiammatorio. Più precocemente si riesce a diagnosticare questi effetti e più efficacemente possono essere controllati con terapie dietetiche e/o farmacologiche.

Scopo dello studio è indagare se le formule per il calcolo dell'insulina resistenza siano facilmente applicabili e siano predittive per lo sviluppo della sindrome metabolica in una popolazione di obesi in età lavorativa.

Abbiamo considerato 154 soggetti afferenti all'ambulatorio Obesità e Lavoro (35 M, 119 F, età media 47 anni) con indice massa corporea (BMI) maggiore di 25. Abbiamo dosato glicemia e insulina a digiuno e dopo due ore da un pasto tipo (circa 930 kcal, carboidrati 60%). In 38 è stato eseguito anche il test di tolleranza al carico orale di glucosio (OGTT).

I parametri biochimici sono stati determinati con strumentazione automatica (Modular P e E – ROCHE).

Sono stati calcolati HOMA (homeostasis model assessment) ($\text{ins} \times \text{glic}/18.33$)/22.5 valori normali <2.5 e ISI (insulin sensitivity index) $1000/[(\text{glic bas} \times \text{ins bas}) \times (\text{glic PP} \times \text{ins PP})]^{0.5}$ valori normali >6,3 (1).

Le correlazioni sono state valutate con la matrice di Pearson e le differenze con test t di Student.

Tabella

Con l'aumentare del BMI si assiste ad un concomitante aumento dei valori di glicemia e di insulina a digiuno; sia HOMA che ISI correlano con questo andamento.

Confrontando ISI e HOMA dopo pasto o dopo OGTT possiamo concludere che anche un più semplice approccio con un pasto controllato che agisca sul pancreas con uno stimolo fisiologico piuttosto che con uno stimolo massimale (OGTT) fornisca indicazioni sullo stato di insulinoresistenza dei soggetti.

Bibliografia

1. Mannucci E et al Diabet Med 20:462-466,2003

BOVY MASS INDEX	25 - 29,99	30 - 34,99	35 - 39,99	> 40,00
Glicemia digiuno	83,51 ± 17,36	91,80 ± 68,75	92,12 ± 26,41	100,16 ± 37,96
Insulina a digiuno	10,29 ± 6,68	13,38 ± 6,50	18,88 ± 19,17	21,02 ± 9,62 *
HOMA digiuno	2,12 ± 1,23	2,76 ± 1,62	4,37 ± 5,0	4,8 ± 3,1 *
HOMA 2h dopo pasto	10,69 ± 8,36	16,56 ± 22,57	23,69 ± 26,52	37,28 ± 42,18
ISI pasto	6,0 ± 3,2	4,1 ± 1,8	3,3 ± 1,9	3,3 ± 2,7 *
HOMA 2h OGTT	18,6 ± 12,1	23,3 ± 20,9	32,8 ± 42,6	27,0 ± 19,7
ISI OGTT	4,3 ± 2,0	3,92 ± 3,16	2,53 ± 0,91	2,78 ± 1,57 *

213

LABORATORY ASSESMENT OF CARDIAC DISFUNCTION BY NT-PRO-BNP IN PATIENTS WITH HEPATOCARCINOMA.

M. Montagnana¹, G. Lippi¹, A. Ruzzenente², M. Fontana², G. L. Salvagno¹, M. Gelati¹, A. Guglielmi², G. C. Guidi¹

¹Sez. di Chimica Clinica, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona

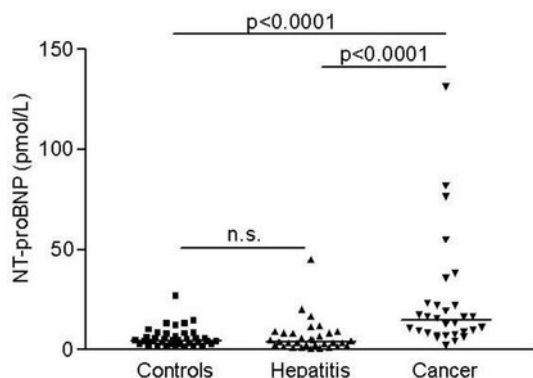
²Sez. di Chirurgia Generale A, Dip. Di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche, Università di Verona

Background. The heart function may be seriously jeopardized in patients affected by hepatocarcinoma secondary to cirrhosis. When cardiac function is explored, a reduction in right ventricular volume probably secondary to reduced venous return, and a left ventricular dysfunction, characterized by left ventricular preload and volume, are observed. Since NT-pro-BNP may play a significant role in the pathogenesis of sodium fluid retention in these patients, the diastolic dysfunction evaluated by assessing NT-pro-BNP may provide meaningful clinical information in the early detection of heart failure.

Methods. Serum NT-proBNP was assayed on the Modular E170 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), together with Troponin T (TnT) and others biochemical parameters in 30 patients affected by hepatocarcinoma secondary to cirrhosis, 33 subjects with hepatitis B or C, and 38 matched healthy controls. Results were compared by Mann-Whitney U test.

Results. TnT values were below the 0.01 ng/ml sensitivity limit of the assay in all subjects. No differences were observed for NT-proBNP between controls and patients with hepatitis (median 4.7 vs 3.9 pmol/L; $p=0.47$). Patients with hepatocarcinoma displayed significantly increased NT-proBNP values versus controls (14.7 vs 4.7 pmol/L; $p<0.001$) and patients with hepatitis (14.7 vs 3.9 pmol/L; $p<0.001$).

Conclusions. NT-proBNP values are significantly increased in patients with hepatocarcinoma. Elevated circulating levels of NT-proBNP in these patients might reflect an increased cardiac ventricular generation of these peptides related to the presence of cardiac dysfunction.



214

IDENTIFICATION OF RESPIRATORY VIRUSES FROM BRONCHOALVEOLAR LAVAGE IN IMMUNOCOMPROMISED PATIENTS USING RAPID SHELL VIAL CULTURE

M. E. Terlizzi¹, M. Bergallo¹, C. Costa¹, F. Sidoti¹, S. Astegiano¹, F. Sinesi¹, P. Solidoro², D. Libertucci², R. Cavallo¹

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

²Pulmonary Division, University of Turin Italy

Introduction. Viral lower respiratory tract infections (LRTI) are an important cause of morbidity in immunocompromised patients. The aim of this study was to evaluate the clinical impact of rapid shell vial cultures from bronchoalveolar lavage (BAL).

Methods. Sixty-seven BAL samples from 46 patients have been retrospectively examined: 51 from 31 transplant recipients and 16 from 15 immunocompromised patients. BAL were inoculated on human embryonic lung fibroblasts and VERO cells to isolate the following viruses: cytomegalovirus (CMV), herpesviruses, varicella-zoster virus, respiratory syncytial virus, adenovirus, Influenza viruses A and B and Parainfluenza viruses. Clinical, microbiological, laboratory, and radiological data were collected.

Results. A LRTI was present in 56.7% of cases: viral 40.3%, bacterial and/or fungal 23.9%, and mixed 7.5%. CMV accounted for 92.6% of viral LRTI. The prevalence of viral infections did not differ between symptomatic and asymptomatic patients; only bacterial and/or fungal infections were significantly more prevalent in symptomatic patients. No clinical, radiological or laboratory feature was significantly associated with the presence of a viral LRTI. In lung transplant recipients the rate of CMV infection was 50%. The result of BAL suggested commencement of antiviral chemotherapy in 25/67 episodes.

Conclusion. Rapid shell vial culture and immunofluorescence techniques from BAL could play an important role in the clinical management of immunocompromised subjects.

References

Kotloff RM, Ahya VN, Crawford SW. "Pulmonary complications of solid organ and hematopoietic stem cells transplantation. Am J Respir Crit Care" Med 2004;170:22-48

215

ROLE OF HUMAN POLYOMAVIRUS BK INFECTION IN PATIENTS WITH LUPUS NEPHRITIS

M. E. Terlizzi¹, C. Costa¹, M. Bergallo¹, F. Sidoti¹, S. Astegiano¹, L. Colla², P. Mesiano², G. P. Segoloni³, R. Cavallo¹

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

²Dept. of Internal Medicine Nephrology Section Molinette Hospital Turin

³Dept. of Internal Medicine Renal Transplant Unit Molinette Hospital Turin, Italy

Introduction. Polyomavirus BK (BKV) reactivation can occur in immunodeficient patients. Few studies of BKV infection in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) nephritis are available(1). Aim of the study was to analyze the prevalence of BKV infection quantifying the viral load and to investigate the possible association with clinical and histological parameters indicating duration, type and activity of SLE.

Methods BKV-DNA was evaluated by Polymerase Chain Reaction (PCR) in serum (sBKV) and urine (uBKV) specimens from 40 patients with SLE nephritis and in 29 healthy controls. Renal function, urinary activity, clinical index of SLE activity (SLEDAI score), CD4+/CD8+ ratio, histological classes and duration of SLE nephritis were compared according to the BKV-DNA-positivity.

Results. sBKV was present in 15% of SLE patients and in 13.8% of controls; uBKV in 32% of SLE patients and in 17.2% of controls. There was no significant difference in terms of kidney function, urinary activity, SLEDAI score and CD4+/CD8+ ratio. Duration of nephropathy tended to be shorter in patients with BKV viremia and/or viruria; proteinuria/creatininuria ratio tended to be higher in patients with positive sBKV and uBKV. BKV-DNA-positivity tended to be more frequent in patients treated with an immunosuppressive agent versus those on steroid treatment.

Conclusions. Reactivation of BKV infection can occur in patients with SLE, although prevalence data do not significantly differ from those obtained in the control group. The trend toward an association between BKV infection and degree of proteinuria and less duration of SLE nephritis could indicate a major susceptibility to develop BKV infection in more active phases of the disease. The role of BKV reactivation in terms of clinical parameters and histological pattern, as well as the role of therapeutic protocols in the onset of BKV reactivation and, conversely, the therapeutic implication of BKV reactivation in SLE patients remain to be defined and should be addressed in further studies on a larger number of patients.

References

1. Sundsfjord A. et al. J Infect Dis 1999;180:1-9.

216

UNCERTAIN ROLE OF POLYOMAVIRUS BK-ASSOCIATED ANTI-dsDNA ANTIBODIES IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

S. Astegiano¹, C. Costa¹, M. Bergallo¹, G. A. Touscoz², F. Sidoti¹, M. E. Terlizzi¹, R. Cavallo¹

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

²S.C.D.U. Gastrohepatology, Laboratory of Digestive and Hepatic Pathophysiology, Molinette Hospital, Turin, Italy

Introduction. Polyomavirus BK reactivation is common in renal transplant recipients and may cause nephropathy with significant graft dysfunction [1]. The induction of anti-dsDNA antibodies by BKV has been described in experimental animals and during primary infection, and a role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus has been suggested.

Methods. In this study, we evaluated the occurrence of anti-dsDNA antibodies and non-organ-specific autoantibodies by indirect immunofluorescence in 90 renal transplant recipients and the association with BKV reactivation as determined by BKV-DNA positivity on urine and/or serum samples.

Results. Forty-four of 90 patients experienced a BKV reactivation; 17/90 developed anti-dsDNA antibodies. Considering the 44 patients with BK viruria and/or viremia, anti-dsDNA antibodies were present in 15 patients vs 29 who did not developed anti-dsDNA antibodies, while in BKV DNA-negative patients 2 were anti-dsDNA-positive vs 44 anti-dsDNA-negative ($p < 0.001$). Considering the 22 patients with BK viremia (with or without viruria), anti-dsDNA antibodies were present in 9 patients vs 13 who did not developed anti-dsDNA antibodies, while in BK viremia-negative patients 8 were anti-dsDNA positive vs 60 anti-dsDNA negative ($p < 0.01$). No significant difference in terms of clinical parameters of renal function was found between anti-dsDNA positive and negative patients.

Conclusions. There is a significant association between BKV and production of anti-dsDNA antibodies in renal transplant patients, however there is no evidence that these virus-induced autoreactive responses are themselves pathogenic.

References

Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. Lancet Infect Dis 2003;3:611-623.

217

EFFECT OF THREE DIFFERENT STRATEGIES ON PLASMA HOMOCYSTEINE IN HEALTHY ADULTS VOLUNTEERSS. Persichilli¹, G. Andria², P. Mastroiacovo³, E. Carnovale⁴, A. Minucci¹, D. Scribano¹, J. Gervasoni¹, B. Zappacosta⁵¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma²Istituto di Clinica Pediatrica, Università Federico II, Napoli³International Centre on Birth Defects, Roma⁴Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Roma⁵Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche Giovanni Paolo II, Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

Background and aims. Mild hyperhomocysteinemia (hcy) is a risk factor for cardio and cerebrovascular diseases resulting from both genetic and nutritional causes. We evaluated the efficacy hcy lowering strategies by using different folate supplementation (A=5-methyltetrahydrofolate, B=folic acid and C=enriched diet) in about 200 subjects.

Methods. 221 subjects out of 1200, whit hcy levels between the 75th and the 97th percentiles, were enrolled in the clinical trial and randomly assigned to four different groups (A, B, C and placebo). Each group was further divided into three strata based on MTHFR C677T genotype (ratio 1:1:1).

Results. Table 1 shows the analysis of hcy variation in the four groups divided on the basis of different genotypes

Conclusions. 1) The three treatments had a similar efficacy on plasma hcy; a 20% reduction in the mean pre-treatment values and an absolute benefit of 35% to decrease hcy by 25%; 2)The results were clinically relevant; 3)MTHFR had a minimal influence on the hcy lowering; 4) The main lowering effect is linked to the moderately high pre-treatment hcy concentrations; 5)Subjects with TT genotype have more "unstable" values and may have a higher decrease in hcy after treatment.

Group	MTHFR	Change %
A	TT	-25,2
	CT/CC	-18,5
B	TT	-7,8
	CT/CC	-23,1
C	TT	-30,7
	CT/CC	-18,9
D	TT	20,7
	CT/CC	0,5

218

DETERMINAZIONE DEI SOLFATI URINARI SU AU600 OLYMPUSA. Latte¹, G. Cangiano¹, M. Russo¹, F. Forte¹, E. Di Maina¹, M. Terribile², M. D'Amora³, A. Risitano¹¹Lab. Patologia Clinica Osp. dei Pellegrini ASL NA 1²U.O. Nefrologia Osp. dei Pellegrini ASL NA 1³Lab. Patologia Clinica Osp. degli Incurabili ASL NA 1

Il dosaggio dei solfati urinari delle 24 ore è ben correlato all'assunzione di proteine animali ed è utilizzato per il monitoraggio e per la prevenzione della calcolosi renale. Col presente lavoro si valuta una nuova metodica fotometrica da noi costruita e messa a punto sull'analizzatore biochimico AU600 della ditta Olympus. I campioni urinari testati dal Laboratorio pervengono da pazienti afferenti all'U.O. di Nefrologia dell'Ospedale dei Pellegrini – ASL NA1.

Il reagente che proponiamo, costituito da 0,2 g di cloruro di bario sciolto in 25 mL di soluzione tampone (4 g di acetato di sodio triidratato e 20 mL di acido acetico glaciale portati ad un litro con acqua distillata), in presenza di ioni solfato dà luogo alla formazione di un precipitato di solfato di bario evidenziato alla lunghezza d'onda di 410 nm.

Lo strumento preleva 8 µL di urina e li aggiunge a 200 µL di reagente; l'aumento dell'assorbanza di tale reazione a termine (END) si estrapola tra i cicli macchina 0 e 5 (ogni ciclo macchina corrisponde a circa 20 secondi).

La calibrazione segue il modello matematico spline 4AB e si effettua con 4 standard di solfato di litio aventi le seguenti concentrazioni: 0 – 50 – 150 e 300 mg/dL.

La linearità del metodo raggiunge i 500 mg/dL.

Il reagente ricostituito è stabile per 1 ora e pertanto preferiamo accodare la seduta analitica alla calibrazione; il reagente è comunque utilizzabile anche nelle successive 48 ore.

Nell'intervallo tra 3 e 500 mg/dL di solfati si evidenzia un profilo di imprecisione con un CV < 3%. Le prove di recupero, effettuate su diluizione scalari di un campione a titolo elevato di solfati, evidenziano valori tra l'80,2 ed il 95,9% (recupero medio del 95,1%).

La precisione nella e tra le serie, mostra un CV% < 3%. Ottima è la correlazione ottenuta tra i valori teorici (x) e quelli sperimentali (y) di urine (a basso contenuto di solfato: 15 mg/dL) a cui sono state aggiunte aliquote crescenti (a partire da 0,1 mL) di una soluzione standard di 600 mg/dL di solfato di litio ($r = 0,9987$; $y = 1,0227 \cdot x - 3,4454$).

Bibliografia

1. A. Latte, G. Cangiano, M. Russo et Al. Dosaggio fotometrico dei solfati urinari. *Biochim Clin* 2006;30,4:398

219

ACCURATEZZA DEI PARAMETRI BIOCHIMICI ED EMATOLOGICI DI UN EMOGASANALIZZATORE OPERANTE COME POC PRESSO UNA UNITA' DI TERAPIA INTENSIVA

B. Barbieri¹, A. Montanelli¹

¹Lab. Analisi, IRCCS Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Milano

Il progresso tecnologico consente una decentralizzazione della medicina di laboratorio, soprattutto verso le unità cliniche di degenza che operano a favore di pazienti critici. Il Laboratorio Analisi dell'Istituto Clinico Humanitas, per mezzo del software "Impact for Critical Care"(IL), tiene sotto controllo 6 emogasanalizzatori GEM Premier 3000 (IL) dislocati presso i reparti di Terapia Intensiva, i Blocchi Operatori ed il Pronto Soccorso.

L'analizzatore GEM Premier 3000 è dotato di un sistema di controllo di qualità automatico (iQM) che intraprende autonomamente azioni correttive e/o di blocco strumentale in caso di malfunzionamento, non soddisfacente ai requisiti pre-imposti.

Per 132 pazienti, i risultati ottenuti sul GEM Premier 3000, operante come POC presso l'unità di Terapia Intensiva di Cardiocirurgia, sono stati posti a confronto con quelli ottenuti sugli analizzatori del Laboratorio Analisi Centrale: LH-750 (Beckman-Coulter) e ci8200 (Abbott). I campioni di ciascun paziente sono stati allestiti durante un'unica seduta di prelievo.

E' stata calcolata la correlazione tra le determinazioni di Sodio, Potassio e Glucosio ottenute su:

-sangue intero eparinato su GEM vs siero su ci8200 ($0.900 < r < 0.918$)

-siero su GEM vs siero su ci8200 ($0.944 < r < 0.989$)

-sangue intero eparinato su GEM vs siero su GEM ($0.888 < r < 0.928$)

e la correlazione tra le determinazioni dell'Ematocrito su:

-sangue intero eparinato su GEM vs sangue intero in EDTA su LH-750 ($r = 0.836$)

I risultati prodotti dal POC, riferiti a quelli prodotti dagli analizzatori del Laboratorio (sottoposti a CQI quotidiano e VEQ periodica secondo le tradizionali norme della buona pratica di laboratorio), hanno evidenziato una buona accuratezza; quindi l'iQM si è rivelato un buon dispositivo di controllo della qualità analitica.

L'inaccuratezza peraltro è stata posta in evidenza più dalla diversità propria dei campioni in esame (sangue intero vs siero), che dall'operato delle diverse tecnologie.

Alla luce dei risultati ottenuti riteniamo di poter affermare che il GEM Premier 3000 rappresenta una soluzione affidabile e di qualità per una postazione POC.

Bibliografia

Kost GJ. Preventing medical errors in point of care testing. Arch Pathol Lab Med 2001;125:1307-1315.

220

VALUTAZIONE DI UN NUOVO SISTEMA PER CHIMICA CLINICA: ABBOTT ARCHITECT C16000

A. La Gioia¹, A. Leoni¹, C. Laube¹, M. Tronchin²

¹Lab. Analisi, Osp. Livorno

²Abbott Diagnostici, Roma

Obiettivi. Valutare un nuovo sistema per chimica clinica (Abbott Architect c16000), verificandone sia le performances analitiche che la correlazione con altri metodi commerciale su parametri di routine.

Metodi. In totale sono stati valutati 27 parametri (Ac. urico, Urea, Trigliceridi, TP, Fosf. alcalina, Amilasi, Albumina, AST, ALT, LDH, Na, K, Cl, Mg, Ca, P, Colesterolo, LDL, HDL, Ferro, Glucosio, GGT, CK, Creatinina, CO2, Bil. totale e diretta). a) Caratteristiche analitiche: la precisione è stata valutata su tre livelli di controllo in base ad un protocollo CLSI (due repliche due volte al giorno per 5 giorni), il limite di rilevazione con analisi di 10 replicati del bianco e del controllo basso, la linearità è stata valutata mediante analisi in triplo di diluizioni scalari di campioni clinici b) Correlazione: i metodi sono stati confrontati con le metodiche in uso sul sistema Modular (Roche) analizzando per ciascuno di 25 parametri (non CO2 e amilasi) 80 campioni di routine.

Risultati. I CV totali erano <6% (tranne per Creatinina, Bil. diretta e CO2) sui controlli bassi (mediana: 2,24%), <5% sui controlli medi (mediana: 3,64%) e <4% (tranne per CO2) sui controlli alti (mediana: 2,53%). La sensibilità analitica era adeguata per tutti i metodi, la linearità (r^2) compresa tra 0,994 e 0,999 (mediana: 0,999). Il confronto tra metodi ha evidenziato un grado elevato di correlazione ($r^2 > 0.947$; mediana: 0,997) per tutti i metodi con l'eccezione di Mg e Bil. totale. Una valutazione preliminare di 10 metodi su campioni di urine ha parimenti evidenziato un'elevata correlazione con i metodi di routine.

Discussione. Le caratteristiche analitiche del sistema Architect c16000 sono apparse estremamente soddisfacenti e i metodi valutati hanno mostrato una eccellente correlazione con altri test, in accordo con quanto recentemente segnalato (1). Le caratteristiche operative del sistema ne consentono una agevole applicazione per una "routine" analitica elevata.

Bibliografia

1. T. Ravalico, M. Alonzo, D. Campbell et al. Assay performance on the Abbott Architect c16000 clinical chemistry analyzer. American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting; Chicago, July 23-27,2006.

221

DETERMINAZIONE DELL'OMOCISTEINEMIA: CONFRONTO TRA IL METODO IMMUNOENZIMATICO FPIA (AxSYM, Abbott) ED UNO IN HPLC (Chromsystems)

C. Novembrino¹, S. Lonati², V. Uva², R. De Giuseppe², G. Defilippi², F. Bamonti²

¹Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano

²Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Fondazione IRCCS, Milano

L'omocisteina (Hcy) è un aminoacido solforato non proteico prodotto nel ciclo della metionina per demetilazione enzimatica. Vari fattori tra i quali difetti genetici a carico degli enzimi e/o deficit delle vitamine metabolicamente correlate (B12 e folato), possono condurre ad un aumento dei livelli plasmatici di Hcy al di sopra del cut-off (10 µM). L'iperomocisteinemia è un noto fattore indipendente di rischio per patologie cardiovascolari, principale causa di mortalità e morbilità nei paesi occidentali. Negli ultimi anni sono state pertanto messe a punto metodiche sempre più precise, sensibili e di facile impiego al fine di rendere il dosaggio di Hcy applicabile alla pratica routinaria.

Scopo dello studio è stato quello di confrontare i valori di Hcy determinati con il metodo immunoenzimatico con fluorescenza a luce polarizzata (FPIA) su analizzatore automatizzato AxSYM (Abbott Diagnostics) con quelli determinati utilizzando un kit per il sistema HPLC isocratico con rivelazione a fluorescenza (Chromsystems). Al fine di valutare un ampio intervallo analitico sono stati dosati campioni di plasma EDTA (1) ottenuti da 17 volontari sani e da 41 pazienti affetti da differenti condizioni patologiche.

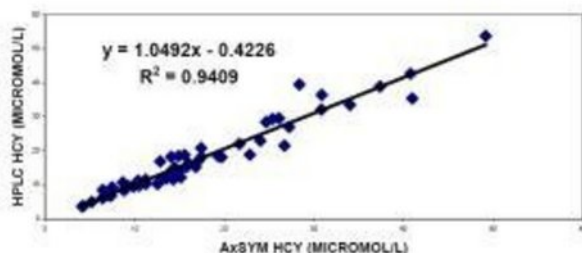
I risultati sono riportati in figura.

L'analisi della regressione lineare evidenzia una buona correlazione ($p < 0.001$) tra i due metodi soprattutto nell'intervallo analitico critico, ovvero per valori di Hcy vicini al cut-off. Si può concludere che i metodi valutati sono equivalenti dal punto di vista della risposta analitica e, quindi, indifferentemente adottabili da ogni laboratorio in base alle specifiche esigenze.

Bibliografia

1. Lonati S. et al, Clin Chem Lab Med 2004;42:228-34

RETTE DI CORRELAZIONE AxSYM VS HPLC



222

DOSAGGIO DELLA DIGOSSINA, CONFRONTO TRA METODI, VITROS 5,1 OCD E DXI BECKMAN

D. Vandini¹, V. Epifani¹, E. Pazzaglia¹, G. Bianchi¹, O. Stocchi¹

¹U.O. Laboratorio Analisi Ospedale di Urbino - ASUR Marche, Zona Territoriale N.2, Urbino

La digossina è il glucoside più ampiamente utilizzato in clinica per il trattamento dell'insufficienza cardiaca associata alla fibrillazione atriale rapida. La determinazione della concentrazione ematica del farmaco è utile quando si ha mancanza di efficacia o sospetto di tossicità.

Gli scopi di questo lavoro sono: 1) valutazione dell'attendibilità analitica del sistema DXI Beckman nel dosaggio della digossina; 2) confronto dei risultati del dosaggio della digossina sulla stessa popolazione di pazienti, di cui il 50% al di fuori dell'intervallo terapeutico, ottenuti con il sistema DXI di recente introduzione nel nostro laboratorio (metodica chemiluminescente) e con il sistema Vitros 5,1 OCD (metodica immunoenzimatica a lettura multipla) da tempo operante come analizzatore di chimica clinica nello stesso laboratorio.

Per lo studio della precisione sono stati utilizzati materiali di controllo del commercio a 2 livelli. Per quanto riguarda la ripetibilità sono stati ottenuti per il 1° e 2° livello D.S. di 0,026 e 0,029 e CV% di 2,12 e 1,64. Per quanto riguarda la riproducibilità sono stati ottenuti per il 1° e 2° livello D.S. di 0,043 e 0,036 e CV% di 3,53 e 2,03. Essendo i materiali di controllo a titolo noto, il valore medio ottenuto dalle nostre repliche rappresenta una stima dell'accuratezza. Per il 1° e 2° materiale di controllo sono stati ottenuti BIAS rispettivamente di +4,96 e -3,89. Il sistema DXI si è rivelato molto lineare con un recupero medio di 106,8%.

Dalla valutazione dei dosaggi mediante la regressione lineare emerge una buona correlazione fra i 2 metodi ($r=0,981$), e l'analisi delle differenze dà una media di 0,051 ed una DS delle stesse di 0,14 (Bland Altman indicativa per interscambiabilità dei metodi).

Da questa sperimentazione emerge che il sistema DXI per il dosaggio della digossina è dotato di notevole attendibilità analitica. I risultati ottenuti con entrambi i metodi sono sovrapponibili. Il sistema DXI ha una sensibilità analitica superiore (limite di rilevanza 0,12 ng/ml contro 0,4 del Vitros). Il sistema Vitros è più veloce: risultati pronti dopo 8' mentre per il DXI dopo 20'.

223

DOSAGGIO DELL'ACIDO FOLICO NEI PAZIENTI EMODIALIZZATI: CONFRONTO FRA METODI

F. Balboni¹, R. Bruzzi³, G. Del Frate³, A. Pierami³, V. Vitale¹, A. Salati¹, M. Gallo², V. Montemurro², A. Del Genovese³

¹Laboratorio Analisi IFCA

²Centro Dialisi Ulivella IFCA

³Laboratorio Analisi Biochimico-Cliniche e Microbiologiche ASL 1

Nei pazienti affetti da insufficienza renale cronica (IRC) in trattamento emodialitico la carenza di acido folico è legata alla scarsa assunzione con la dieta e alle perdite attraverso le procedure di emodialisi. Il dosaggio del folato sierico e il dosaggio dei folati intraeritrocitari consentono di determinarne la carenza allo scopo di perfezionare la terapia di supplementazione con acido folico.

Data la possibile sottostima dei valori sierici di acido folico riportata in metodica nei pazienti affetti da IRC, abbiamo confrontato i risultati dei folati sierici e intraeritrocitari ottenuti con il metodo a cattura ionica e con il metodo CLIA.

Ottantatré campioni di siero e 41 di plasma EDTA di pazienti emodializzati sono stati centrifugati e conservati al buio a 4°C e analizzati entro 48 ore dal prelievo. I dosaggi di acido folico sierico e intraeritrocitario sono stati eseguiti con metodo CLIA su Immulite 2000 Medical Systems® e con metodo a cattura ionica su Axsym Abbott®.

L'analisi di regressione Deming dei risultati dei folati sierici ottenuti con le due metodiche ha mostrato una intercetta di -336.54 e una slope di 25.98, il coefficiente di correlazione di Pearson è stato pari a 0.40, l'analisi di Bland-Altman ha evidenziato una differenza media tra le metodiche di -62.01 ng/mL (95% CI da -260.65 a 136.61 ng/mL) statisticamente significativa ($p < 0.0001$). La regressione di Deming per i valori dei folati intraeritrocitari è risultata avere una intercetta di -21885.15 e una slope di 23.14, il coefficiente di Pearson è stato di 0.37, mentre la differenza media ottenuta con l'analisi di Bland-Altman è stata pari a -2070.97 ng/mL (95% CI da -5826.96 a 1685.01 ng/mL) ed è risultata statisticamente significativa ($p < 0.0001$).

Il metodo a cattura ionica rispetto al metodo CLIA mostra una netta sottostima su tutti gli ambiti di valore, sia per il folato sierico e intraeritrocitario, rendendo i due metodi non interscambiabili. Da un punto di vista clinico nei pazienti con IRC è sempre consigliabile effettuare il dosaggio dei folati intraeritrocitari data la buona correlazione mostrata da entrambi i metodi con la terapia(1).

Bibliografia

1. Sepe V et al. High-dose folic acid supplements and responsiveness to rHu-EPO in HD patients. NDT 2006 Jul;21(7):2036

224

ESPERIENZA DI UN ANNO PER L'APPLICAZIONE DEL DOSAGGIO DEL PTH-INTATTO IN FASE INTRA-OPERATORIA

F. Balboni¹, B. Morrocchi¹, A. Salati¹, V. Vitale¹, A. Occhini², R. Artusi², C. Sartori³, D. Di Martino³, I. Kutschera³, P. Cicchi²

¹Laboratorio Analisi IFCA Firenze

²S.O. Chirurgia IFCA Firenze

³DiaSorin SpA Saluggia VC

Obiettivo. Valutazione del rapporto Costo/Beneficio del monitoraggio intraoperatorio del PTH effettuato con il test DiaSorin LIAISON®.

Materiali e metodi. Per il dosaggio dell'i-PTH sono disponibili metodiche rapide ELISA ed CLIA; in questo caso si è utilizzato il test N-tact PTH (CLIA) su strumentazione LIAISON® presente nel Ns. Lab. Analisi. La Ns. struttura fino ad oggi si era avvalsa della struttura di un vicino ospedale, con tempi medi di risposta di 90 minuti dal prelievo e con costi elevati. Sono stati valutati 22 pazienti sottoposti a paratiroidectomia per HPT Primario, Secondario o Terziario (Calcemia media: 11,2 mg/dl; i-PTH medio: 344 pg/ml). La procedura prevede un Operatore Laureato per la messa in opera dello strumento. Il tempo di refertazione del test dal momento del prelievo è mediamente di 35 min, e già dopo 10 min dalla paratiroidectomia si è evidenziato un calo significativo dell'i-PTH.

Conclusioni. Il dosaggio dell'i-PTH cosituisce un presidio imprescindibile nella chirurgia dell'HPT. I pazienti esaminati hanno evidenziato una riduzione del 73% (range: 55-93%) nel valore di i-PTH a 10' dall'exeresi, con attestazione dell'i-PTH a 28 pg/ml a 24h dall'intervento, seguita da una normalizzazione della Calcemia (valore medio di 9,3 mg/dl). I dati ottenuti in fase intra-operatoria, oltre a quelli del breve follow-up di i-PTH e Calcemia (a 24 h, 2 gg., 7 gg., 30 gg.), dimostrano la validità clinica del test LIAISON® N-tact PTH (CLIA) in un contesto intra-operatorio, applicabile anche alle strutture medio-piccole come la Ns. laddove non si possa utilizzare il test rapido. Inoltre il rapporto Costo/Beneficio è evidenziato dall'interessante risparmio economico: da una spesa prevista per i 22 pazienti di circa 14.000 Euro al netto delle spese di trasporto e del personale, l'effettiva spesa sostenuta è stata di circa 2.700 Euro al lordo di costo/test effettivo (test in doppio, calibrazioni, controlli) e costo del personale dedicato, con un risparmio netto maggiore di 11.000 Euro.

Bibliografia

1. Pelizzo et al. Osp.Ital Chir 04/2004

225

A COMPARATIVE STUDY OF THE NEW ACCESS HBS AG ASSAY AND THE HBS AG CONFIRMATORY ASSAY FROM BECKMAN COULTERF. Bouniort¹¹Beckman Coulter Eurocenter, Nyon, Switzerland

Background. We compared the relative sensitivity and specificity of the new Access HBs Ag assay with Abbott AxSYMTM HBs Ag V2.

Methods. Analytical sensitivity was compared by testing the BBI PHA 106 panel including 15 points with HBs Ag titer within 0.05 and 0.6 IU/mL. Clinical sensitivity was investigated using various panels for subtypes, genotypes or variants, 30 commercialized seroconversion panels, and 100 positive samples. Negative sample repartition was compared with 577 negative samples collected in a French hospital.

Results. All low titer panel members up to 0.05 IU/mL were recognized by the Access HBs Ag assay, whereas AxSYM HBs Ag failed to recognize 2 of them up to 0.1 IU/mL. All subtypes, genotypes and variants tested were recognized by both methods. Results were equivalent for 18 panels among the 30 tested. The Access HBs Ag assay was more sensitive with 10 panels and less sensitive with 2 panels. All 100 positive samples were found positive, displaying 100% of agreement. The specific margin, defined as the number of SD between the negative sample mean and the cut-off, was 21 for the Access HBs Ag assay and 5.5 for AxSYM HBs Ag.

Conclusion. The performance of the Access HBsAg assay is at least equivalent to AxSYM HBsAg V2. The Access HBs Ag assay can be used on the Access Immunoassay System and on the high-throughput UniCel DxI 800 Immunoassay System offering rapid and accurate results whatever the throughput requirement of the lab.

241 words

Presenting author: Bouniort F.

Poster accepté: M288

226

ANALYTICAL PERFORMANCE OF THE NEW ACCESS HBsAb ASSAYF. Bouniort¹¹Beckman Coulter Eurocenter, Switzerland

The purpose of this study was to assess the analytical performance of the new Access HBsAb assay.

Analytical sensitivity was determined using WHO1st IRP, SFTS and internal panels. Limits of blank (LoB), detection (LoD), and quantitation (LoQ) were tested. The accuracy was validated by testing 5 dilutions of WHO standards (from 0 to 800mIU/ml). Linearity was verified by using 4 HBsAb positive samples diluted from neat to 1/64. Precision (intra-/inter-assay & inter-lot) was studied with 4 selected sera. Potential hook effect was tested with high HBsAb positive samples (>58,500mIU/mL). No hook effect was observed.

The analytical sensitivity was estimated to be 1.87, 0.81 and 0.79mIU/mL for WHO, SFTS, and Bio-Rad panels, respectively. The LoB, LoD and LoQ were 0.1, 0.52, 0.91mIU/ml, respectively. The Access HBsAb assay exhibited 101.8% recovery between WHO theoretical and actual results. An excellent linearity of the assay ($R^2 > 0.996$) was noted. The calculated CV on the overall study showed excellent precision with CV of $\leq 5\%$.

The new Access HBsAb assay provides excellent analytical performance and can be used on the family of Access immunoassay systems. 1,493 (max.1,500)

227

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF THE NEW Access HBsAb assay

F. Bouniort¹

¹Beckman Coulter Eurocenter, Switzerland

HBsAb is a marker of immunity and its presence indicates an immune response to HBV infection, vaccination or the presence of passively acquired antibody.

Performance of the new Access HBsAb assay was assessed in specificity and sensitivity studies.

Specificity was evaluated on 1450 HBsAb negative samples (with known status) from blood donors in France. Potential impact due to cross reactivity was investigated by testing samples of patients with a history of Myeloma, Renal Failure, HAV, HAMA, Influenza, HSV, Toxoplasma, Rubella, EBV, HCV, HIV, HTLV, or CMV.

Studies were performed to verify potential interference due to an abnormal concentration of human albumin, haemoglobin, bilirubin, and triolein.

Clinical sensitivity was evaluated by testing samples from 50 HBsAb positive (vaccinated) subjects and 261 HBsAb positive (HBV-resolved) subjects. Access HBsAb assay exhibited a specificity of 98.76%. No cross reaction or any interference was detected.

The clinical sensitivity evaluated by testing a total of 311 HBsAb positive samples was determined to be 98.4%.

The new Access HBsAb assay offers acceptable clinical sensitivity and specificity.

228

COMPARATIVE STUDY OF THE NEW Access HBsAb ASSAY

F. Bouniort¹

¹Beckman Coulter Eurocenter, Switzerland

A new immunoassay for the detection and the quantitative determination of HBsAb in human serum and plasma has been developed by Beckman Coulter.

We compared the performance of the Access HBsAb assay with the Abbott AxSYM* AUSAB assay using 774 samples classified as HBV-negative. We tested 11 seroconversion panels, 134 samples of vaccine follow-up, 50 HBV-vaccinated (Engerix* vaccine) and 270 HBV-resolved patients.

The agreement between the Access HBsAb and AxSYM AUSAB assays was 97.8% on the 774 samples.

Data on seroconversion panels showed that the Access HBsAb assay gave comparable results to the AxSYM AUSAB assay for 8 panels. The Access assay was more sensitive with 2 panels and less sensitive with 1 panel. The concordance between the Access and AxSYM assays was 97.8% in the vaccine follow-up and HBV-vaccinated specimens (184 samples).

In a resolved HBV population, the agreement of Access HBsAb assay was 98.10% and 96.30% with hospital sites' results and AxSYM assay results respectively.

The performance of the Access HBsAb assay was statistically equivalent to that of the AxSYM AUSAB assay.

*All trademarks are property of their respective owners.

229

DETECTION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBS AG) SUBTYPES, GENOTYPES, MUTANTS AND EVALUATION OF POTENTIAL HOOK EFFECT USING THE NEW ACCESS HBS AG AND CONFIRMATORY ASSAYS.

F. Bouniort¹¹Beckman Coulter Eurocenter, Nyon, Switzerland

Background. Genetic HBsAg variants may escape immunoassay detection leading to erroneous results. Another risk for misdetection is a false negative result due to high concentration of HBsAg (hook effect). A study was conducted to characterize the detection of subtypes, genotypes and mutants; and to investigate the potential hook effect of the new Access HBsAg and HBsAg Confirmatory assays.

Methods. Subtype recognition was tested with the STFS 2004 Subtype Panel, containing 8 different HBsAg subtypes (adw2, adw4, adr, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, and ayr). Genotype recognition was tested with seven genotypes A-G from the Teragenix HBV Genotype Panel. A panel of 15 recombinant mutant proteins, each containing single or multipoint mutations located at 22 different amino acid positions in the S protein ectodomain, was tested to investigate reactivity towards genetic mutations. Five very high positive samples, containing 200 to 300 µg/ml of HBsAg and a spiked mixture of Ad + Ay HBsAg (approximately 5 mg/mL), were tested to investigate potential hook effects.

Results. All subtypes in the STSF 2004 Panel, genotypes of the Teragenix HBV Panel, and recombinant HBsAg mutant proteins were detected and confirmed positive without ambiguity with the Access HBsAg assay. No false negative results, due to high amount of antigen (~5 mg/mL in the highest case), were observed among the 6 samples tested.

Conclusion. The Access HBsAg and Confirmatory assays provide excellent sensitivity for the detection of HBsAg mutants, subtypes and genotypes; and are not impacted by high antigen concentration.

230

PERFORMANCE OF AN AUTOMATED CHEMILUMINESCENT ASSAY FOR THE DETECTION OF ANTI-HEPATITIS A VIRUS IGM ANTIBODIES: ACCESS HAV IGM ASSAY

F. Bouniort¹¹Beckman Coulter Eurocenter, Nyon, Switzerland

Background. The AccessHAV IgM was studied for imprecision, clinical sensitivity and specificity, comparison with a reference method and for negative samples distribution.

Methods. Intra-assay and interassay imprecision was tested on multiple replicates during respectively 1 and 5 days. Sensitivity was studied on 210 samples from patients with acute hepatitis A and on 157 samples from clinical follow-up/seroconversions cases. Results were compared with a commercially EIA technique; discrepant results were confirmed using a third EIA method. The specificity was evaluated on a normal population (n = 1535) and on a population with potentially interfering pathologies (n=429). A comparison study with a commercialized automated HAV IgM assay was performed on 620 samples. The negative samples repartition was studied on 706 blood donor samples.

Results. Imprecision was less than 10% CV for positive samples. Sensitivity was 99.04% with individual samples and 100% with seroconversion/clinical follow-up cases. The Access HAV IgM assay demonstrated a specificity of 99.93% with a normal population and 99.53% with the population of potentially interfering pathologies. The comparison study exhibited an overall agreement of 98.40%, a relative specificity of 99.35% and a relative sensitivity of 97.40%. After further analysis, 7 from the 10 discrepant results were correctly tested with the AccessHAV IgM. The negative sample distribution showed that 93.90% of the results are lower than 0.3 S/CO.

Conclusion. The AccessHAV IgM assay shows good precision, sensitivity, specificity and a good distribution of the negative samples.

231

SENSITIVITY STUDY OF THE NEW ACCESS HBS AG AND HBS AG CONFIRMATORY ASSAYS FROM BECKMAN COULTER

F. Bouniort¹

¹Beckman Coulter Eurocenter, Nyon, Switzerland

Background. Accurate detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) is important to aid in the diagnosis of individuals infected with hepatitis B virus. The purpose of this study was to evaluate the analytical and the clinical sensitivity of the new Access HBsAg and HBsAg Confirmatory assays.

Methods. The analytical sensitivity was determined using various commercialized panels (French SFTS 2004, PEI Ad, PEI Ay, WHO 80/549 standard, WHO 00/588 standard). The clinical sensitivity was verified with the low titer panel BBI PHA 106, 100 commercial HBsAg positive samples and 30 seroconversion panels.

Results. Analytical sensitivity was estimated to be \leq 0.1 ng/mL (French SFTS panel), 0.020 PEI Units/mL (ad panel), 0.024 PEI Units/mL (ay panel), 0.092 IU/mL with WHO 80/549 HBsAg standard and 0.056 IU/mL with WHO 00/588 HBsAg standard. All low titer panel members up to 0.05 IU/mL were recognized by the Access HBsAg assay. All positive samples were found and confirmed positive displaying 100% of sensitivity for the Access HBsAg assay. The Access HBsAg assay demonstrated equivalent results as compared to Abbott AxSYMTM HBsAg V2 for 18 panels among the 30 tested. For the remaining panels, the Access assay was more sensitive in 10 out of 12 cases.

Conclusion. The Access HBsAg assay provides excellent analytical and clinical sensitivity performance and can be used either with the Access Immunoassay System or with the high-throughput UniCel Dxl 800 Immunoassay System for rapid and accurate results in the management of HBV infection.

232

SPECIFICITY STUDY OF THE NEW ACCESS HBS AG AND HBS AG CONFIRMATORY ASSAYS FROM BECKMAN COULTER

F. Bouniort¹

¹Beckman Coulter Eurocenter, Nyon, Switzerland

Background. An HBs Ag assay should detect HBs Ag protein variability but also demonstrate high specificity. A specificity study was conducted using blood bank samples and potentially interfering reactions were investigated using the new Access HBs Ag assay.

Methods. Internal evaluation of the specificity was performed on 4343 blood donors samples collected by blood banks. Potential cross-reactivity was evaluated by testing a panel of 293 samples from patients with 21 potentially cross-reactive infections and auto-immune disorders. Samples with high concentrations of human albumin, hemoglobin, bilirubin, triolein and biotin were also tested. To evaluate anticoagulant and SST impacts, matched sets of negative samples containing serum, EDTA K2, EDTA K3, Citrate, Lithium Heparin, ACD and SST were tested.

Results. The Access HBs Ag specificity for blood donor samples was determined at 99.98 % [99.87 – 100%] (CI 95) and the specific margin, defined as the number of SD between the negative samples mean and the cut-off was equal to 21. Among all the samples tested for cross-reactivity, two (0.68%) gave positive results in the screening assay, but were not confirmed with the Access HBs Ag Confirmatory assay. Sample components and different anticoagulants tested had no impact on the assay specificity.

Conclusion. The Access HBs Ag and the Access HBs Ag Confirmatory assays provide excellent specificity without cross reactivity with potentially interfering components. Moreover, the assay showed an excellent specific margin that prevents specificity issue due to negative sample repartition close to the cut off.

233

NUOVA METODICA COAGULATIVA PER LA DETERMINAZIONE DELL'OMOCISTEINA: CONFRONTO TRA METODIG. Andreani¹, S. Storti¹, R. Antonucci¹, C. Martinelli¹, G. Pucci¹, A. Del Genovese¹¹Laboratorio Analisi Biochimico-Cliniche e Microbiologiche ASL1 Massa-Carrara²Istituto di Fisiologia Clinica del CNR Ospedale Pasquinucci Massa

L'iperomocisteinemia rappresenta un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo e la progressione della malattia cardiovascolare aterosclerotica.

Scopo. In questo lavoro abbiamo confrontato i risultati ottenuti dosando l'omocisteina (Hcy) plasmatica con l'analizzatore AxSYM (Abbott®) metodo FPIA e con l'analizzatore ACL TOP (IL®) che valuta i livelli di omocisteina con un test immunologico al lattice.

Materiali e metodi. Per poter confrontare le metodiche, abbiamo prima considerato l'idoneità di campioni dello stesso paziente con anticoagulanti diversi. In particolare abbiamo valutato la possibile differenza ottenibile su ACL TOP in campioni di sangue eparinato e in sodio-citrato (NC) dosando 30 campioni di donatori sani. Successivamente 96 campioni di sangue eparinato sono stati dosati con entrambe le metodiche ed i risultati valutati statisticamente.

Risultati. ACL TOP utilizza per il dosaggio dell'Hcy campioni di sangue in NC o EDTA mentre su AxSYM l'Hcy è dosabile su siero, plasma eparinato o EDTA, ma non in NC. Abbiamo dosato su ACL TOP campioni dello stesso paziente raccolti in NC e in eparina ottenendo una buona correlazione ($n=30$, $Hcy\ eparina = 0,021 + 1,21 \times Hcy\ NC$; $R^2 = 0,964$, $p < 0,0001$) anche se esiste fra i campioni con due anticoagulanti diversi una differenza statisticamente significativa (test t a dati appaiati $n=30$, $p < 0,0001$). Confrontando i 96 campioni eparinati sui due strumenti, si ottiene la seguente retta di regressione: $Hcy\ AxSYM = -1,342 + 1,218 \times Hcy\ ACL$; $R^2 = 0,983$. Fra i due metodi di dosaggio esiste una differenza statisticamente significativa ($n=96$, $p < 0,0001$, test t a dati appaiati) con una differenza media di circa l'11%.

Conclusioni. Dai dati ottenuti si evince che i valori di Hcy ottenuti dai dosaggi su ACL in eparina e in NC sono diversi. La stessa Ditta IL consiglia di usare un fattore di conversione di 1.17 molto simile a quello da noi ottenuto (1.21). Poichè la differenza media dei risultati dei dosaggi sui due strumenti è di circa l'11%, bisognerà tenerne conto nell'interpretazione clinica dei risultati e si dovrà confermare con ulteriori studi se i valori di riferimento dell'omocisteina dosata sui due strumenti siano effettivamente gli stessi.

Bibliografia

1. Zighetti M.L. Haematologica 2002;87:89-94

234

CONFRONTO TRA METODICA RADIOIMMUNOLOGICA E METODICA IN ELETTROCHEMILUMINESCENZA NEL DOSAGGIO DELL'ENOLASI NEURONE SPECIFICA (NSE)G. Barbina¹, U. Qualizza¹, A. Colatutto¹, E. Tonutti¹, S. Mazzolini¹, P. Sala¹¹Dip. di Diagnostica di Laboratorio Azienda Ospedaliero - Universitaria "S. Maria della Misericordia" Udine

Obiettivo. L'Enolasi Neurone Specifica è uno dei marcatori tumorali più specifici per tumori neuroendocrini e per il carcinoma polmonare a piccole cellule: determinazioni sequenziali di questo isoenzima sono utili e a basso costo nel "follow up" di tali neoplasie. Scopo del lavoro è il confronto tra una metodica manuale IRMA ed una metodica elettrochemiluminescente automatica per il dosaggio dell'Enolasi Neurone Specifica nel siero.

Materiali e metodi. Sono stati raccolti e congelati a -20°C fino all'analisi 66 campioni di siero. La concentrazione di NSE è stata determinata con i reattivi IRMA (CIS-bio international B.P.32-F91192 GIF-SUR-IVETTE CEDEX/France) e confrontata con i dati ottenuti con la metodica ECLIA (NSE Roche Diagnostics GmbH D-68298 – Mannheim – Germany)

Risultati. Una prima analisi mostra un intervallo di concentrazione da 1,6 a 184 ng/mL per la metodica IRMA e da 0,588 a 270.6 ng/mL per quella ECLIA. La correlazione risulta buona ($r = 0,977$) con lieve sovrastima della metodica ECLIA che si accentua nei valori più elevati ($y = 1,28x - 4,15$).

La precisione analitica totale ha mostrato un C.V. di 3.4% per il metodo radioimmunologico e si attestava su 2.9% in elettrochemiluminescenza. Per concentrazioni < 50 ng/mL, range nel quale si colloca la maggior parte dei dati, la correlazione non è risultata ottimale. Non si osservano tuttavia differenze di comportamento nei confronti dei rispettivi intervalli di riferimento.

Conclusioni. La comparabilità delle metodiche risulta buona in termini sia statistici che clinici. I bassi CV indicano che i prodotti offrono garanzie di efficacia analitica. Differenze significative sono evidenti nei campioni con valori di NSE bassi o estremamente elevati: risulta una maggiore efficacia della metodica elettrochemiluminescente nel riconoscere esigue concentrazioni di enzima nel siero e nel fornire valori più attendibili a concentrazioni elevate. In conclusione segnaliamo una indubbia superiorità della metodica ECLIA nel dosaggio dell'Enolasi Neurone Specifica in quanto permette di ottenere CV sensibilmente migliori, mostra range di linearità decisamente più ampi, aumenta la velocità di analisi e utilizza traccianti non radioattivi accessibili anche a laboratori non attrezzati in tal senso.

235

CONFRONTO TRA METODO IN CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE E METODICA ENZIMATICA (MINIAS) SU STRUMENTO OLYMPUS PER IL DOSAGGIO DELL'OMOCISTEINA

G. Barbina¹, A. Colatutto¹, R. Zaglia¹, S. Mazzolini¹, U. Qualizza¹, P. Sala¹

¹Dip. Diagnostica di Laboratorio Az. Osp. Universitaria S. Maria della Misericordia, Udine

Obiettivo. Confronto tra la metodica in Cromatografia Liquida ad Alta Pressione (HPLC) e la metodica enzimatica su strumento Olympus per la determinazione della Omocisteina sierica

Metodologia. Presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Udine sono stati processati 148 sieri per la ricerca dell'omocisteina (Hcy). I campioni sono stati aliquotati e per il dosaggio in HPLC è stato utilizzato un'apparecchiatura HPLC della ditta Beckman, in cui la fase preanalitica prevede il trattamento con agenti riducenti (acido tricloroacetico) e legame con fluoroforo, mentre per la metodica enzimatica è stato utilizzato l'analizzatore Olympus AU2700 (Homocystein T, ditta Minias).

Risultati. L'analisi statistica dei valori ottenuti dalla determinazione dell'Hcy in HPLC ha mostrato una media di 13,52 e mediana di 10,75 $\mu\text{Mol/L}$, mentre su Olympus con metodica enzimatica una media di 20,42 e mediana di 17,35 $\mu\text{Mol/L}$. I dati sono stati elaborati mediante regressione lineare, dalla quale emerge un'ottima correlazione tra i due metodi considerati ($r = 0,984$). Le due metodiche sono state confrontate con il test di Bland-Altman, da cui si evidenzia che le differenze tra i due metodi non sono costanti ma dipendono dal valore. La deviazione standard aumenta all'aumentare della concentrazione, sebbene al di sotto delle 30 mM/L. I punti si trovano all'interno dell'intervallo di confidenza di $\pm 1,96$ DS, valore di concentrazione al di sotto della quale i due metodi forniscono risultati congruenti tra loro. Le due metodiche possono essere pertanto considerate intercambiabili.

Considerazioni. Lo studio dell'omocisteina su campioni di popolazione ha fatto emergere la necessità di introdurre il dosaggio tra i test di screening per pazienti a rischio di malattie tromboemboliche e malattie cardiovascolari (CVD). La determinazione dell'omocisteina non è più una metodica sperimentale effettuata su selezionati campioni di popolazione, ma è utilizzata per la valutazione del rischio complessivo di CVD. Il nostro contributo è consistito nello sviluppare una metodica alternativa all'HPLC: infatti riteniamo che il test enzimatico, per le sue caratteristiche di affidabilità e totale automazione, possa sostituire la procedura in HPLC.

236

DETERMINAZIONE DELLA GLUCOSIO 6 FOSFATO DEIDROGENASI SU AU400 OLYMPUS

G. Cangiano¹, A. Latte¹, M. Russo¹, F. Forte¹, E. Di Maina¹, G. Barone², G. Allegretti De Lista², M. D'Amora³, A. Risitano¹

¹Lab. Patologia Clinica Osp. dei Pellegrini ASL NA 1

²Lab. Patologia Clinica Distretto 47 ASL NA 1

³Lab. Patologia Clinica Osp. degli Incurabili ASL NA 1

Il deficit di glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PD) è causa di una particolare forma di anemia emolitica. La carenza è ereditaria e viene trasmessa da un gene parzialmente dominante localizzato sul cromosoma X. L'aumentata richiesta di dosaggio di tale enzima in campo ginecologo ed il non trascurabile tempo impiegato per effettuare la determinazione manuale su fotometro da banco, alla temperatura di 30°C, ha indotto il nostro Laboratorio ad adattare il kit della ditta Trinity Biotech – metodo all'U.V. di Kornberg e Horecker – sull'analizzatore biochimico AU400 della ditta Olympus.

La calibrazione su tale strumento prevede l'utilizzo di un campione di sangue a titolo noto la cui attività enzimatica è stata dosata in precedenza col macrometodo manuale di riferimento. Le successive sedute analitiche saranno effettuate facendo riferimento al fattore di conversione (tipo MB; K = 33684).

Ad 80 μL di reagente R1 (NADP 1,5 mmol/L, maleimmide 12 mmol/L, tampone) vengono miscelati 5 μL di campione (100 μL di sangue anticoagulato con EDTA e 400 μL di acqua distillata: si raccoglie il sovrantante dopo centrifugazione per 5' a 1000 g).

Dopo opportuna incubazione (circa 10 cicli macchina) l'analizzatore biochimico inserirà 160 μL di reagente R2 (glucosio 6 fosfato 1,05 mmol/L, tampone e sale di magnesio). La lettura in cinetica si effettua tra i cicli 24 e 27 alla lunghezza d'onda primaria di 340 nm. Nell'intervallo analitico compreso tra 150 e 2500 Unità di G6PD si evidenzia un profilo di imprecisione con un CV% < 5%. Al di sotto di tale range di concentrazione il coefficiente di variazione può raggiungere anche valori prossimi al 9% e precisamente a 99 ng/mL (controllo deficitario). Le prove di recupero mostrano coefficienti di variazione compresi tra l'88,3 ed il 109,6% (recupero medio del 102,4%). Le prove di precisione nella serie e tra le serie, mostrano CV% inferiori al 3%. Il metodo proposto su strumentazione AU400 della ditta Olympus (y) è stato correlato con il macrometodo di riferimento (3,0 mL di reagente e 0,01 mL di sangue) della ditta Trinity Biotech (x) ($y = 0,983.x; r^2 = 0,9994$).

Bibliografia

Pincus MR, Zimmermann HJ, Henry JB. Enzimologia Clinica. Diagnosi clinica e metodi di laboratorio. Delfino Editore. 2001;1,13:315-6.

237

EVALUATION OF A NEW SDS AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-AGE) KIT FOR URINARY PROTEINS CHARACTERISATIONG. Martino¹, M. Ungaretti¹¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, Fondazione S. Maugeri, Pavia

Assessment of amount and composition of human urinary proteins is useful to collect information about many different kinds of pathological conditions, such as damage in the nephron or presence of BJP.

A new kit for sodium dodecyl sulphate-agarose gel electrophoresis (SDS-AGE) for urinary proteins has been evaluated.

Analysis has been performed on 30 urine samples from healthy patients as control, and from patients with recognised renal pathology or with monoclonal proteins in serum (urinary proteins concentration ranges: < 0.07-3.00 g/l, evaluated with pyrogallol red). In order to calculate method sensibility some pathological samples has been diluted.

All samples have been analyzed also by routine non denaturing ETF and IFE with antisera for light chains, low molecular weight and high molecular weight proteins. Different fractions have been measured scanning gels with a gel analysis software.

Compared results show that SDS-AGE appears to be useful for evaluation of patterns of proteinuria and semiquantification of BJP.

References

W.H. Siede, A. Regeniter, 'Proteinuria-Diagnostica e Interpretazione con le proteine marker'—Le Proteine dal Laboratorio alla Clinica, CEFAR Castrocaro, 24-26 ottobre 2001

238

TIPIZZAZIONE DI CRIOGLOBULINE: STANDARDIZZAZIONE DELLA FASE PREANALITICA E CONSOLIDAMENTO NELLA ROUTINE DELLE IMMUNOFISSAZIONI SIEROPROTEICHEG. Passerini¹, M. Trbos¹, A. Motta¹, M. Locatelli¹, M. Murone¹¹Diagnostica e Ricerca San Raffaele S.p.A. IRCCS San Raffaele Milano

Introduzione. Nostro obiettivo è standardizzare una procedura preanalitica, che permetta di gestire le crioglobuline (CRG) come i sieri da sottoporre a immunofissazione (IFE) e di soppiantare i metodi dedicati, che richiedono tempo e risorse. Abbiamo valutato il Criokit (Helena-Alfawassermann) per stabilire se la procedura preanalitica proposta riduce gli artefatti causati dalle peculiari caratteristiche fisico-chimiche delle CRG e consente una più chiara interpretazione dei pattern immunoelettroforetici. Abbiamo verificato i criteri di idoneità alla IFE dei campioni di CRG trattati con una soluzione a matrice proteica che disaggrega in modo irreversibile il crioprecipitato e premette valutazioni sia quantitative che qualitative.

Materiali e Metodi. I sieri di 63 pazienti sono stati trattati secondo le linee guida per la ricerca di CRG (1). Il criocrito era compreso tra <1% e 29%. Le CRG sono state lavate 3 volte a 2000g x 15' a 4°C con soluzione A e diluite 1:5 con soluzione B del Criokit. I campioni disaggregati in modo irreversibile sono stati sottoposti a dosaggio delle proteine (Modular Roche) a elettroforesi e a IFE su gel d'agarosio (Helena-Alfawassermann) utilizzando le metodiche per le sieroproteine. Per confronto 27 campioni, risolubilizzati a 37°C, sono stati processati con metodica dedicata IFE a 37°C, su Hydrasis (Sebia).

Risultati. Come prevedibile, diluendo 1:5 le CRG con soluzione B, non si ottiene sempre la concentrazione proteica attesa a causa della estrema variabilità biochimica delle CRG. Tuttavia eseguendo un'elettroforesi preliminare, si ottiene un utile indicatore per ottimizzare, se necessario, la diluizione delle CRG prima della IFE. I campioni trattati sono stabili per 10 giorni conservati a 4°C e possono essere gestiti a temperatura ambiente come sieri. I pattern immunoelettroforetici ottenuti con Criokit presentano meno artefatti rispetto a quelli ottenuti risolubilizzando le CRG in soluzione fisiologica a 37°C.

Conclusioni. Criokit permette di inserire la tipizzazione di CRG nella routine delle IFE sieroproteiche con evidenti vantaggi gestionali. Le soluzioni di trattamento facilitano anche il recupero dei crioprecipitati più scarsi.

Bibliografia

1. Kallemuchikkal U et al. Evaluation of Cryoglobulins. Arch Pathol Lab Med 1999;123:119-125

239

FASE PREANALITICA: IL CORRETTO UTILIZZO DELLE PROVETTE

L. Bassi¹, L. Comelini¹, S. Rizzardi¹

¹Laboratorio analisi chimico cliniche e microbiologia, Azienda Istituti Ospitalieri

Il Centro Immunotrasfusionale effettua dal 2002 raccolte domenicali di sangue da sezioni Avis esterne. Per la raccolta inizialmente si utilizzavano provette con anticoagulante monoiodoacetato per conservare la glicemia, in quanto i campioni erano testati il giorno successivo.

Il passaggio ad un sistema di prelievo a vuoto nel 2006 ha portato a modificare le provette da utilizzare, ma mantenendo sempre il corretto controllo della glicemia. Le provette scelte, in plastica, utilizzano come anticoagulante NaF/potassio ossalato (tappo grigio), in quanto il monoiodoacetato richiedeva l'uso di provette in vetro.

I campioni, non centrifugati, dopo conservazione per 24h in frigorifero risultano però emolizzati e fortemente opalescenti. E' stata effettuata, quindi, una valutazione dei parametri normalmente richiesti sulle due tipologie di provette in uso in chimica clinica:

- tappo verde chiaro con litio eparina e gel separatore
- tappo grigio con NaF/potassio ossalato (curve da carico di glucosio)

Le provette, prelevate secondo le modalità consuete dalle sacche di trasfusione, sono dosate in giornata e dopo 24h di conservazione in frigorifero con e senza centrifugazione.

I risultati delle analisi hanno evidenziato come i prelievi in tappo verde chiaro, se centrifugati, mantengono stabili tutti i parametri compreso il glucosio, lo stesso vale per le provette tappo grigio, ma il plasma è torbido ed emolizzato.

Il confronto tra i dosaggi eseguiti in giornata su tappo verde e grigio centrifugato hanno evidenziato una variazione su alcuni analiti:

colesterolo 18.36%, proteine totali 17.37%, trigliceridi 17.76%, sideremia 13.0% e GPT 15.0%.

Alla luce dei risultati ottenuti si è deciso di utilizzare le provette tappo verde chiaro con gel separatore, centrifugate e dosate il giorno successivo. Queste provette garantiscono un plasma perfettamente limpido e risultati sovrapponibili a quelli normalmente ottenuti sui campioni di routine.

Pertanto la scelta corretta del tipo di provetta al momento del prelievo è fondamentale per garantire risultati accurati.

240

UN NUOVO METODO AD ALTA SENSIBILITÀ PER IL DOSAGGIO DEL D-DIMERO: DD-HS (INSTRUMENTATION LABORATORY). CORRELAZIONE CON IL METODO STANDARD E VALUTAZIONE ECONOMICA

M. Nicoli¹, R. Facchinetti¹, A. Cabrini¹, A. Cremon¹, E. Lanzoni¹, L. Lipa¹, R. Mainardi¹, M. Soldati¹, P. Rizzotti¹

¹Lab. di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche Ospedale Civile Maggiore Verona

Scopi. Valutare prestazioni e costi del metodo ad alta sensibilità DDHS verso il metodo in uso DD (IL).

Materiali. Strumento ACL TOP (IL). Metodo DD: immunoturbidimetrico, Ab monoclonale MA-8D3. Linearità da 0.20 a 1.05 mg/L. Per concentrazioni superiori lo strumento esegue diluizioni del campione 1:5 ed 1:25 portando il limite di linearità a 26.25 mg/L. Metodo DDHS: immunoturbidimetrico, Ab MA-8D3 frammento Fab. Linearità da 0.15 a 3.68 mg/L. Per concentrazioni superiori lo strumento esegue diluizione del campione 1:15 portando il limite di linearità a 69 mg/L. IL dichiara che il DDHS, rispetto al DD, ha minori interferenze con fattore reumatoide (FR) e con altri FDP, assenza di effetto prozona fino a 197 mg/L. Per entrambi i metodi il valore superiore dell'intervallo di riferimento è 0.25 mg/L.

Metodi. Su 129 campioni scelti casualmente è stato determinato il D-dimero sullo stesso strumento con entrambi i metodi.

Risultati. Correlazione fra i metodi: regressione R quadrata 0.927. $y = 1.14x - 0.23$; Bland Altman: il 98.44 % dei campioni è all'interno di 2 DS.

Concordanza clinica: con valore di cut-off per entrambi i metodi di 0.25 mg/L la concordanza clinica è del 91.4%.

Ripetizioni su campione diluito: la refertazione di 129 campioni ha richiesto con metodo DD 183 determinazioni (54 ripetizioni) e con il metodo DDHS 147 determinazioni (18 ripetizioni).

Il tempo macchina per singolo test è di 6'24" per il DD, e di 4'54" per il DDHS.

Conclusioni. I metodi sono ben correlati fra loro. Due punti outliers nel Bland Altman si riferiscono ad un campione con alti livelli di FR e ad un campione che con il metodo DD ha dovuto essere diluito manualmente. La concordanza clinica è soddisfacente. Su base annua la stima del carico di lavoro per 5228 richieste di D-dimero (storico 2006), comprensiva di test, ripetizioni e controlli è di 8616 per il DD, e di 7157 per il DDHS; il tempo necessario è di 919 h per il DD e di 584 h per il DDHS. Il costo per referto risulta equivalente. L'adozione del nuovo metodo DDHS è vantaggiosa dal punto di vista del rapporto costi/benefici.

Bibliografia

Quantification of D-dimer using a new fully automated assay: its application for the diagnosis of deep vein thrombosis. *Haematologica*. 2000 May;85(5):520-4.

241

PRESTAZIONI ANALITICHE DELL' ANALIZZATORE HM-JACK PER LA VALUTAZIONE QUANTITATIVA DI SANGUE OCCULTO FECALEM. Poggesi¹, S. Rapi², M. Confortini¹, T. Rubeca¹¹Centro per lo Studio e la Prevenzione Oncologica, CSPO, Firenze²Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

Introduzione. Evidenze scientifiche consolidate hanno dimostrato l'efficacia dello screening su il carcinoma del colon retto basato sulla ricerca del sangue occulto fecale¹.

Scopo dello studio. è stata la valutazione delle prestazioni analitiche (precisione, linearità e comparazione con OC-Sensor micro Eiken) del sistema HM-Jack (Kyowa Medex).

Materiali e metodi. L'imprecisione del metodo è stata valutata analizzando tre campioni (S1-S3) con concentrazione intorno al valore di cut-off, 100 ng/mL, e due livelli di controllo (C1, C2). I campioni sono stati testati in duplicato per 8 giorni, 2 sessioni analitiche al giorno (NCCLS EP5-A). Sono state dunque calcolate l'imprecisione totale, l'imprecisione nella serie (within-run) e quella fra le serie (between-run). La linearità del metodo è stata valutata mediante diluizioni seriali di un pool ad alta concentrazione di emoglobina con un pool a bassa concentrazione (NCCLS EP6-A). Nella comparazione sono stati analizzati in duplicato 34 campioni a concentrazione fra 0 e 855 ng/mL. I dati sono stati analizzati mediante regressione lineare e test non parametrico di Bland-Altman.

Risultati e conclusioni. L'imprecisione totale (CV) per i campioni S1, S2 e S3 (rispettivamente 69, 87 e 117 ng/mL), è risultata compresa fra il 6.9% e l'8.2%, per i controlli C1 e C2 (24 e 106 ng/mL) fra il 6,4% e l'8,1%. L'imprecisione nella serie: 1.5%-2.5% per S1-S3 e 1.7%-5.5% per C1, C2. L'imprecisione fra le serie: 4.4%-6.8% per S1-S3 e 4.5%-4.7% per C1, C2. Per quanto riguarda lo studio della linearità del metodo, i parametri della retta di regressione per n=7 sono risultati: pendenza=1.01, intercetta=-6.48 e coefficiente di correlazione Pearson R=1. La retta di regressione nello studio di comparazione (n=34) ha mostrato, pendenza=1.00, intercetta=-7.54 e R=0.99. L'analisi secondo Bland-Altman ha evidenziato deviazioni significative (scarto>10%) dalla media solo in 2 campioni su 34 (6%). Le prestazioni del sistema studiato appaiono in linea con le richieste avanzate in termini di precisione e di linearità. Il valore predittivo positivo, la specificità e la sensibilità del test verranno valutati nell'ambito di uno studio comparativo su una popolazione sottoposta a screening.

Bibliografia

1. Mandel JS et al. N Engl J Med 2000;343:1603-7

242

ANALIZZATORE ABX PENTRA 400: PERFORMANCE ANALITICA CON RIFERIMENTO AL PROGRAMMA DI VALUTAZIONE ESTERNA DELLA QUALITÀ DELLA REGIONE LOMBARDIAR. Consonni¹, C. Franzini¹¹Lab. di Analisi, Casa di Cura Capitanio, Milano

ABX Pentra 400 (Horiba ABX, Roma) è un analizzatore per chimica clinica, con possibilità di 55 tipologie analitiche "on board" e produttività di 420 esami/ora, esaurientemente valutato (Coudène P, et al. Clin Chem Lab Med 2005;43:782-92). Introducendolo nel nostro laboratorio ne abbiamo verificato la performance in riferimento al programma di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ) della Regione Lombardia. Nella verifica sono state incluse 28 analisi, suddivise in "metaboliti", "enzimi", "proteine" e "ioni e metalli". In via preliminare, riferiamo sulla elaborazione di 294 coppie di valori trovato/atteso (da 10 a 12 coppie per analisi), utilizzando come parametro di accordo/disaccordo lo "scarto Z". Z è il valore della differenza (trovato - atteso) diviso per la deviazione standard dei risultati del "gruppo": essendo normalizzato ed adimensionale consente la valutazione comparativa di misurazioni differenti. Dei 294 valori complessivi di Z, 11 (3,7 %) risultavano >4, ed erano momentaneamente scartati come aberranti: i rimanenti 283 si distribuivano abbastanza simmetricamente, con 2,5°, 50° e 97,5° percentile pari a, rispettivamente, -1,87, 0,26 e 2,77. 60,4 % dei valori di Z erano compresi nell'intervallo ±1; 89,0 % nell'intervallo ±2; 98,6 % nell'intervallo ±3; 1,4 % erano compresi tra +3 e +4. I valori medi di Z per le singole analisi erano compresi: tra -0,92 e 0,97 (metaboliti); tra -1,40 e 1,70 (enzimi); tra -0,17 e 0,97 (proteine); tra -0,59 e 0,29 (ioni e metalli, esclusi due valori medi "aberranti", 1,85 per P e 1,51 per Mg). Gli 11 valori aberranti (Z > 4) riguardavano AMI, ALP, IgG e IgM. La aberranza delle due Ig veniva corretta dopo le prime 4 analisi di VEQ, e rimaneva successivamente sotto controllo. La ancora carente standardizzazione, accentuata dalla reale "disomogeneità" del gruppo di confronto, possono spiegare i risultati per AMI ed ALP. Non abbiamo riscontrato la sovrastima del ferro precedentemente riportata. In conclusione, per quanto concerne gli analiti considerati, il sistema fornisce risultati in accordo con quelli del programma di VEQ della Regione Lombardia.

243

EVALUATION OF TWO AUTOMATIC SYSTEMS FOR MEASUREMENT OF THE ERYTHROCYTE SEDIMENTATION RATE

R. Zenobi¹, S. Ballerini¹, L. Bellincampi¹, F. G. Viola¹, G. Federici¹

¹Department of Laboratory Medicine, University-Hospital of "Tor Vergata" Rome, Italy

Our aim was to compare two different automated devices for the measurement of the length of erythrocyte sedimentation rate (LSRB) in order to decrease the amount of blood sample collected. We compared VES-MATIC 60 (DIESSE s.p.a., Grosseto, Italy) with VES-CUBE 200 (DIESSE s.p.a., Grosseto, Italy), that requires K2-EDTA and sodium-citrate blood samples, respectively. A total of 160 whole blood samples from patients of the Laboratory Medicine of University Hospital "Tor Vergata" Rome were included in this study; LSRB was determined following ICSH recommendations. Linear regression analysis was used for accuracy study; Reproducibility was assessed using an internal quality control for at least one month (mean = 6.93, SD = 0.775 CV=10.5).

Our data showed statistically significant correlation between the two different systems, when the data of VES-CUBE 200 were adjusted to 18°C by Manley's normogram. Moreover, both systems presented a good reproducibility and similar CV value.

In conclusion, both systems can be used for LSRB determination with the same range of reference; in addition, our previous study showed that LSRB values on plasma-citrate or on K2-EDTA were the same on VES-MATIC 60, therefore the automatic system for LSRB measurement, VES-CUBE 200, shows important advantages on one hand it decreases the amount of whole blood collected being the sample undiluted, on the other hand the test can be performed on the same tube collected for hemochrome analysis, using K2-EDTA as anticoagulant.

References

1. Caswell M, Stuart J. Assessment of Diesse Ves-matic automated system for measuring erythrocyte sedimentation rate. *J Clin Pathol* 1992 Feb;45(2):184

244

VALUTAZIONE DELL'ANALIZZATORE PER CHIMICA CLINICA F560 (MENARINI)

S. Gabrielli¹, R. Ciuti¹, D. Franceschi², S. Cisternino²

¹Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi, Firenze

²A. Menarini Diagnostics, Firenze

Introduzione: L'F560 Menarini è un nuovo analizzatore da banco completamente automatizzato in grado di effettuare fino a 560 determinazioni/ora (test fotometrici e ISE). Può portare fino a 60 reattivi più il modulo ISE ed è dotato di un sistema barcode reagenti e campioni che assicura la chiusura del sistema. Sulla macchina possono essere caricati fino a 72 campioni considerando le posizioni refrigerate (dedicate a calibratori e materiali di controllo) e le posizioni non refrigerate (per i campioni di routine). Lo scopo di questo studio è quello di valutare le performance analitiche di questo sistema.

Materiali e metodi: sono stati presi in considerazione 35 diversi analiti (substrati, enzimi, elettroliti e plasmaproteine) e per ciascuno di questi sono state valutate:

- l'imprecisione nella serie e tra le serie (utilizzando un pool di sieri freschi congelati e 2 materiali liofilici a diversi livelli).
- la linearità
- la correlazione con una apparecchiatura di routine ben consolidata (ADVIA Bayer).

È stato inoltre valutato il carry-over legato al campione ed ai reattivi.

Risultati: le imprecisioni nella serie sono risultate tutte al di sotto dei rispettivi traguardi analitici ed anche le imprecisioni tra le serie sono in gran parte nettamente inferiori alle rispettive performance analitiche accettabili. Tutti i metodi testati hanno evidenziato un comportamento lineare in un ampio range analitico. Il carry-over legato ai reattivi (saggiato con la combinazione dei reattivi AST e LDH) è risultato non significativo, così come quello relativo ai campioni. Il confronto con ADVIA è stato eseguito su 40 campioni per ogni componente cercando di coprire l'intero range analitico. Con questi confronti sono stati ottenuti coefficienti di correlazione compresi fra 0,8089 e 0,9991, rette di regressione con pendenza compresa fra 0,7677 e 1,1779 e intercette trascurabili.

Conclusioni. L'F560 è risultato essere un analizzatore semplice da usare, affidabile (nessun guasto di rilievo si è verificato durante il periodo di utilizzo), dotato di buona flessibilità e con buone prestazioni analitiche.

245

DETERMINAZIONE DEL RAPPORTO CISTIN /CREATININA URINARIA SU AU400 OLYMPUS

A. Latte¹, G. Cangiano¹, M. Russo¹, F. Forte¹, E. Di Maina¹, A. Garofalo¹, M. D'Amora², M. Terribile³, A. Risitano¹

¹Lab. Patologia Clinica Osp. dei Pellegrini ASL NA 1

²Lab. Patologia Clinica Osp. degli Incurabili ASL NA 1

³U.O. Nefrologia Osp. dei Pellegrini ASL NA 1

Non raramente la nefrolitiasi è dovuta ad un difetto di riassorbimento tubulare di cistina, pertanto diventa fondamentale l'apporto del Laboratorio di Patologia Clinica nei trattamenti terapeutici, quindi nella riduzione della frequenza di recidive calcolotiche.

Nel nostro studio si utilizzano campioni di urina della mattina e delle 24 ore provenienti dall'Ambulatorio di Nefrologia dell'Osp. dei Pellegrini, ASL NA 1.

Il dosaggio dell'amminoacido si basa sulla riduzione del gruppo disolfuro della cistina e degli altri disolfuri, da parte del solfito. I gruppi sulfidrici formati reagiscono con acido fosfotungstico per dare luogo al blu di tungsteno, letto a 600 nm. L'utilizzo di un bianco blocca i gruppi sulfidrici formati grazie alla presenza di cloruro mercurico. La determinazione si effettua sull'analizzatore Olympus AU400 allestendo due distinte metodiche: una che dosa tutti i gruppi sulfidrici (150 µL di reag.1: 2,5 mL di t. acetato, 0,75 mL di solfito di sodio e 1,75 mL di acqua; 100 µL di reag.2: ac. fosfotungstico 25%) e l'altra (bianco) che determina i gruppi sulfidrici non derivanti dalla cistina (150 µL di reag.1: 2,5 mL di t. acetato, 0,75 mL di solfito di sodio, 1,25 mL di acqua ed 0,5 mL di cloruro mercurico; 100 µL reag.2: ac. fosfotungstico 25%). Ambedue le metodiche con reazione a termine utilizzano 50 µL di urina ed uno standard di 5 mg/dL di cistina. La determinazione della creatinuria (metodo Jaffé) prevede una diluizione automatica di 1:20 del campione urinario. Nell'intervallo analitico 1 – 25 mg/dL di cistina (linearità del metodo) si evidenzia un profilo di imprecisione con un CV% < 5% e le prove di recupero mostrano CV% di 83,7 – 100,9% (recupero medio: 99,0%). L'analisi statistica, effettuata con metodo non parametrico, si riferisce a 200 raccolte urinarie delle 24 ore. L'intervallo di riferimento risulta compreso tra 0,0107 e 0,0335 mmoli cistina/mmol creatinuria ed i relativi intervalli di confidenza al 90% sono di 0,0100-0,0126 e 0,0314-0,0390 mmoli/mmol. In un primo e rapido screening è possibile utilizzare anche campioni di urina estemporanea.

Bibliografia

Screening della cistinuria (metodo al fosfotungstato) su AU600 Olympus e proposta di intervalli di riferimento. *Biochimica Clinica* 2005;29,2:268.

246

VALIDAZIONE DI UN METODO IN HPLC-MS-MS PER LA DETERMINAZIONE DI TIMIDINA, DESOSSURIIDINA E ALTRI NUCLEOTIDI NEL FOLLOW-UP DELLA MNGIE

A. Mastrone¹, V. Catanzaro², L. Brunasso Cattarello², B. Ferrero³, M. Vincenti², R. A. Salvo¹

¹Area Chimico-Clinica, Consorzio Regionale Antidoping "Alessandro Bertinaria", Orbassano, Torino

²Dip. Chimica Analitica, Università degli Studi di Torino

³Div. Neurologia, ASO San Luigi Gonzaga, Torino

L'Encefalomiopatia Mitocondriale NeuroGastroIntestinale (MNGIE) è caratterizzata dalla presenza di sintomi neurologici e gastrointestinali.

La MNGIE, trasmessa come carattere autosomico recessivo, è causata da mutazioni del gene ECGF1 codificante per l'enzima timidina fosforilasi (TP) (22q13.32) che catalizza la conversione della timidina in timina. I pazienti affetti da MNGIE presentano livelli ematici e urinari di timidina e deossuriidina più alti rispetto alla norma.

Scopo di questo lavoro è stato la validazione di un metodo di analisi semplice, veloce (15min) e affidabile per il dosaggio sierico di analiti (citosina, uracile, citidina, uridina, deossuriidina, timina, timidina) strettamente correlati alla diagnosi ed al follow-up di MNGIE. A tale scopo si è utilizzato l'HPLC accoppiato con la spettrometria di massa-tandem (HPLC-MS-MS), per la sua alta selettività, specificità e sensibilità. La separazione dei sette analiti e dello standard interno (timina-3H) è stata ottenuta su una colonna con fase stazionaria C18 utilizzando come fasi mobili l'acetato di ammonio ed il metanolo in un gradiente di concentrazione. Come rivelatore si è utilizzato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo in modalità Multiple Reaction Monitoring, utilizzando le transizioni fra lo ione precursore quasi molecolare ed almeno un frammento per ogni analita. Le fasi di trattamento del campione sono state ridotte al minimo per evitare perdite di analiti e lunghi tempi di analisi, diluendo semplicemente il siero con acetato di ammonio ed aggiungendo lo standard interno. I volontari sani prima del prelievo hanno seguito per due giorni una dieta priva di cioccolato, liquori, merendine confezionate, caffè, thea, banane, soft drink, liguizia e carne rossa.

Il protocollo di validazione comprende prove di linearità, di precisione intraserie e interserie, valutazione della sensibilità e del limite di rilevabilità. Le prove sono state effettuate su un pool di sieri di 10 volontari sani, su siero di 1 paziente affetto da MNGIE e su campioni di volontari sani positivamente nel range di concentrazioni normali e patologiche. I dati dello studio evidenziano una buona linearità e ripetibilità del metodo.

247

PLASMA TAURINE QUANTIFICATION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH LASER INDUCED FLUORESCENCE DETECTIONA. Zinellu¹, S. Sotgia¹, B. Scanu¹, M. Sanna¹, M. E. Sini¹, F. Serralutzu¹, E. Ricciardi¹, L. Deiana¹, C. Carru¹¹Chair of Clinical Biochemistry, Dept of Biomedical Sciences University of Sassari

Taurine is a sulphur-containing amino acid largely distributed in mammals tissues, where it is present in millimolar concentrations, while in body fluids is at micromolar levels. It has been thoroughly reported how taurine plays an important role in a variety of physiological functions, pharmacological actions and pathological conditions. Currently, available analytical methods for the determination of taurine alone or with other amino acids are based on HPLC after ortho-phthaldialdehyde (OPA), fluorescamine or dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride derivatization. Moreover, capillary electrophoresis methods have been also described using OPA as derivatizing reagent or other reagents such as dansyl chloride, naphthalene dicarboxaldehyde or fluorescamine. However, long derivatization times, excessive side products production or poor sensitivity prevent the application of these methods on a large number of samples. In this work we describe a new method for taurine quantification in plasma by CE-LIF detection. Taurine is derivatized with fluorescein isothiocyanate at 100°C in 20 minutes. These conditions allow to reduce pre-analytical times and to derivatize quantitatively the taurine contained in the reaction mixture contrarily to the room temperature derivatization commonly adopted. FITC-taurine adduct is analyzed in an uncoated fused-silica capillary, 75 µm I.D. and 40 cm effective length using a 20 mmol/L tribasic sodium phosphate buffer pH 11.8, at 22 kV in less than 15 minutes. To avoid the typical problems due to the instability of FITC-adduct we use the homocysteic acid as internal standard. The loss of FITC-taurine signal during the sequence analysis is compensated by the same loss of FITC-internal standard adduct, thus giving a noteworthy improvement in the assay precision. The method shows a good reproducibility of the migration times (CV%, 1.93) and the peak areas (CV%, 3.65). Intra- and interassay CV were 4.63 and 6.44%, respectively, and analytical recovery was between 98.1 and 102.3%. Assay application was tested measuring taurine plasma levels in 50 healthy volunteers in which a mean value of 60.2 ± 17.9 µmol/L was found.

248

ASSESSMENT OF PROTEIN-INCORPORATED ARGININE METHYLATION IN BIOLOGICAL SPECIMENS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS UV-DETECTIONB. Scanu¹, A. Zinellu¹, S. Sotgia¹, S. Pasella¹, A. Baralla¹, M. A. Cuccuru¹, G. Pintus², A. M. Posadino², L. Deiana¹, C. Carru¹¹Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari²Istituto di Biochimica Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari

Protein arginine methyltransferases (PRMTs) post-translationally methylate arginine residues in proteins to synthesize monomethylarginine (MMA), asymmetric dimethylarginine (ADMA), or symmetric dimethylarginine (SDMA). Protein arginine methylation is involved in the regulation of signal transduction, RNA export, and cell proliferation. Moreover, upon proteolysis, arginines are released into the cytosol in which they exert important biological effects. Both MMA and ADMA are inhibitors of nitric oxide synthase (NOS) and especially elevated levels of ADMA are associated with endothelial dysfunction and cardiovascular disease. Therefore, the assessment of protein methylation degree may provide information about the mechanisms involved in its modification affecting important biological processes and also on the status of ADMA biosynthesis, as key molecule involved in vascular damage. Quantification of these analytes is commonly performed by HPLC after sample cleanup and derivatization. We propose a capillary electrophoresis method in which these steps have been avoided and the procedure for sample preparation has been simplified. After acidic hydrolysis of proteins, samples were dried, resuspended in water and directly injected in capillary electrophoresis. A baseline separation of analytes are reached in a 60 cm x 75 µm ID uncoated silica capillary, by using a Tris phosphate run buffer at pH 2.15 in about 18 minutes. Precision tests indicate a good repeatability of the method both for migration times (CV<0.45%) and areas (CV<2.73%). A good reproducibility of the intra-assay and inter-assay tests was obtained (CV<4.55% and CV<6.05 % respectively). This method allows an accurate assessment of the degree of protein arginine methylation in several biological samples such as whole blood, plasma, red blood cells, cultured cells, tissue. Moreover the good sensitivity let to evaluate the methylation of a single protein type after the opportune purification steps. Our method applicability concerns both clinical laboratories in which evaluation of blood protein from numerous samples could be rapidly performed, and research laboratories where the factors affecting the degree of arginine protein methylation could be easily studied.

249

INVESTIGATING BIOCHEMICAL MODELS' BACKGROUND: THE PROTEOMIC APPROACH FOR BOVINE BRAIN MICROCAPILLARIES' PROPERTIES ASSESSMENT

C. Ialongo¹, F. Tabacco³, A. Vitale³, M. Borro⁴, G. Gentile⁴, R. Rea⁶, M. Simmaco⁴, I. Antonozzi¹, P. Cardelli²

¹*Cattedra Patologia Clinica I, Dip. Medicina Sperimentale, I Facoltà di Medicina Università "La Sapienza"*

²*Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, II Facoltà di Medicina Università di Roma "La Sapienza"*

³*U.O.C. Diagnostica di Laboratorio, Az. Ospedaliera S. Andrea di Roma*

⁴*Dip. Scienze Biochimiche, II Facoltà di Medicina Università di Roma "La Sapienza"*

⁵*U.O.D. Diagnostica Molecolare Avanzata, Az. Ospedaliera S. Andrea di Roma*

⁶*Azeinda Sanitaria Locale RmB*

Despite of their validity as an in vitro model for blood brain barrier biochemical studies, freshly-isolated bovine Brain Microcapillaries^{1,2} (bBMC) are poorly characterized in their genome and proteome. Our aim was to assess homogeneity of bBMC model's properties regarding possible differences due to its source from various cortical regions, by investigating its endothelial background via a wide-view, proteomic 2D Elctrophoresis-based approach. Briefly, from whole cattle (*Bos taurus*) brain, frontal and occipito-parietal cortex have surgically separated, independently processed for extracting microcapillary tissue, and finally submitted to 2D SDS-PAGE/Digitalized Image Analysis Comparison.

Among more than four hundred spots recognized in each series of the gel performed, after the statistical review by ANOVA analysis, only then have shown to differ slightly into quantitative expression profile. That, and the absence of quantitative differences between them two, can be considered as an assessment of model's homogeneity.

Anyway, our investigation must be mostly considered as a preliminary step into a wider characterization of an in vitro model, and further as a first insight into relationship between blood-brain barrier and its topology.

References

1. Brendel K, Meezan E, Carlson EC
"Isolated brain microvessels: a purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex", *Science*. 1974 Sep 13;185(4155):953-5
2. Hjelle JT, Baird-Lambert J, Cardinale G, Specor S, Udenfriend S.
"Isolated microvessels: the blood-brain barrier in vitro", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Sep;75(9):4544-8.

250

DISTURBANCES OF ONE-CARBON METABOLISM IN TREATED PATIENTS WITH PARKINSON' S DISEASE

M. C. Gueli¹, R. Camarda²

¹*Dip. di Scienze Biochimiche, Policlinico, Università di Palermo*

²*Dip. di Neuroscienze Cliniche, Policlinico, Università di Palermo*

Introduction. L-DOPA alone or in combination with a peripheral dopa decarboxylase inhibitor (DDI) is the most effective therapeutic agent to improve motor function in most patients with Parkinson's disease (PPD). However, chronic L-DOPA therapy is associated with side-effects arising particularly during long-term therapy. Only a small percentage of an exogenous dose of L-DOPA is converted into dopamine (DA) in the brain. The majority is transformed into DA and O-methyldopa (3-OMD). To raise brain DA levels, a large amount of L-DOPA must be administered. It has been reported that such large doses of L-DOPA can affect sulphur amino acid metabolite levels. Therefore, O-methylation of L-DOPA to 3-OMD is linked with conversion of SAM to S-adenosylhomocysteine (SAH). SAH is subsequently split into adenosine and Hcy.

Objective. To evaluate the impact of long-term application of L-DOPA/DDI formulations on plasma methionine (MET), SAM, SAH and tHcy levels in PPD.

Methods. Patients were from the Section of Neurology R.N., Palermo University. There were 10 PPD treated with L-DOPA/DDI formulation and 10 healthy controls. Peripheral blood samples were taken in the morning after the subjects had fasted and were off medication for at least 12 hrs. Plasma tHcy and sulphur metabolite levels were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) as reported.

Results. The levels of MET and SAM in the treated PPD were significantly lower (approximately 1.21 and 1.32 fold, respectively) than in the controls while the levels of tHcy (mean 16.6 $\mu\text{mol/L}$; SD 4.4) were higher compared with controls (mean 9.8 $\mu\text{mol/L}$; SD 3.4). No significant differences in SAH levels appeared. Based on these findings, we hypothesized that another consequence of high-dose e/or long-term L-DOPA administration might be hyperhomocysteinaemia and may also represent a risk factor for both ischaemic heart and cerebrovascular disease in treated PPD. Besides, the resulting hyperhomocysteinaemia might be increased if L-DOPA therapy is superimposed on a condition known to impair Hcy metabolism, such an enzyme defect or B/acid folic vitamin deficiency.

References

- Wise CK et al. (1995) *J Liq Chromatogr* 18,2005.

251

L-DOPA MONITORING IN TREATED PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

M. C. Gueli¹

¹Dip. di Scienze Biochimiche, Policlinico, Università di Palermo

Introduction. L-DOPA, alone or in combination with a peripheral dopa decarboxylase inhibitor (DDI) remain the gold standard to improve motor function in the most of patients with Parkinson's disease (PPD). However, in some the long-term therapy of large L-DOPA doses is associated with side-effects. L-DOPA may exert its toxic effects by inducing cell membrane lipid peroxidation and rupture. Wick et al. showed that L-DOPA and DA can inhibit several vital enzymatic pathways of DNA repair leading to apoptosis.

Objective. For an optimization of parkinsonian therapy, we report a simple method for the simultaneous monitoring of L-DOPA and its metabolites by HPLC with electrochemical detection (ED) using a method similar (1).

Methods. Master stock solutions of the L-DOPA, 3OMD, DA were prepared at 1.0 mmol/l in 0.4 M PCA. The HPLC system consisted of a Model 306 pump, a Rheodyne 7125, a Model 141 Amperometric ED (Gilson) and a Symmetry C18 column. The oxidation voltage was set at 0.70V vs Ag/AgCl reference electrode (5nA/V). The mobile phase was 50mM phosphate buffer pH 3.2 - methanol-acetonitrile (88:8:4, v/v/v). Calibration curves were obtained from a pool of drug-free plasma spiked with seven concentrations: 30-1000 ng/ml L-DOPA, DA and 60-2000 ng/ml 3-OMD. Blood samples from PPD receiving one oral dose of L-DOPA/carbidopa were centrifuged at 1200g for 5 min at 4°C. and deproteinized by 70% PCA. The supernatant (100µl) was added to 100µl of 2M citrate buffer pH 4.5, centrifuged and 20µl was injected into the HPLC system.

Results. The R.T. were: L-DOPA 3.33 ± 0.08; 3OMD 5.89 ± 0.06; DA 8.93 ± 0.07 minutes (means ± SD). Calibration curves showed a linear correlation between concentration and peak area (r=0.998). The absolute recovery of plasma assay for all catechols was calculated by comparing peak area of standard solutions with peak area measured by injecting deproteinized blank pooled plasma spiked with known quantities of the standards. The assays were specific with respect to L-DOPA, DA, 3OMD which are products of normal metabolism and were present in the blank plasma and 0-h plasma collections. At pH 3.2 no interfering peaks were observed in samples for any of the catechols measured.

References

Rondelli I (1994) J Chromatogr 653:17-23.

252

ANALYTICAL INTERFERENCES IN GLUCOSE AND GAMMA - GLUTAMYLTRANSFERASE DETERMINATIONS IN A PATIENT WITH WALDENSTROM DISEASE

S. Baroni¹, M. Antenucci¹, E. Di Stasio¹, F. Romitelli², P. Corsale¹, C. Zuppi¹

¹Inst. of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

²CSS Hospital- IRCCS, San Giovanni Rotondo, Foggia, Italy

We report an analytical interference observed in the routine analysis of a 65 year old man with Waldenstrom disease. Falsely low glucose (G) and increased gamma - glutamyltransferase (gGT) levels were found. Several interferences causing false results have already been described in samples containing paraproteins, depending on sample turbidity due to immunoglobulin precipitation. The extent of interference can vary considerably by different analytical conditions such as pH, ionic strength and additives, even in samples with similar amounts of IgM.

Methods. G and gGT were measured by Olympus AU2700 analyzer, using Olympus kits (G: hesokinase method and gGT: IFCC colorimetric method)

Results. We observed very low glucose (14 mg/dl) and high gGT (70 IU/L) levels in Li-heparin sample of a patient with monoclonal IgM kappa (IgM 51.7 g/L), in absence of hypoglycemia symptoms. The G and gGT reaction monitor showed absorbance increasing after addition of reagent 1 (R1), significantly higher than normal readings, thus suggesting a specific interference in these reactions. We repeated G and gGT determinations using samples of serum, K-EDTA, Na-citrate and Na fluoride-K-oxalate and an alternative glucose method (glucokinase), obtaining normal absorbance reactions and normal results (G 109 mg/dl, gGT 40 UI). Pathological results were again obtained mixing serum and heparin; the interference occurred only in heparin sample and with hesokinase method. Li-heparin in combination with R1 triggered the formation of aggregates with IgM and we observed that the addition of sodium chloride to the plasma was able to contrast this phenomenon.

Conclusion. The analytical interferences by paraproteins in routine laboratory tests are not easily predictable; nevertheless we suggest that serum sample or charged additives as NaCl, may help to reduce or eliminate these analytical errors.

References

Berth M, Delanghe J. Protein precipitation as a possible important pitfall in the clinical chemistry analysis of blood samples containing monoclonal immunoglobulins: 2 case reports and a review of the literature. Acta clin Belg 2004;59:263-273

253

C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE (CNP) AND NT-PRO-CNP IN RAYNAUD'S PHENOMENON: DISEASE SEVERITY MARKERS?

S. Del Ry¹, A. Della Rossa², M. Maltinti¹, M. Cabiati¹, E. Vesprini², L. Bazzichi², S. Bombardieri², M. Emdin¹, D. Giannessi¹

¹CNR, Institute of Clinical Physiology, Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, Pisa, Italy

²Dipartimento di Medicina Interna, U.O. Reumatologia, Università di 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.

Aim. Was to evaluate whether the levels of these peptides are increased in a population of patients affected by Raynaud phenomenon, either primary or secondary to systemic sclerosis.

Methods. 30 no-smoker patients have been enrolled to date, 12 affected by systemic sclerosis according to ACR criteria and 18 by primary Raynaud's phenomenon (4 M, 26 F, mean age: 50 years, range: 21-73). Significant co-morbidities, such as hypertension, diabetes, obesity, hypercholesterolemia, renal failure, were ruled out. NT-proCNP, that circulates at higher concentrations than CNP and allows a direct assay and the use of smaller amounts of plasma, was determined in all patients by using a direct ELISA (Biomedica Gruppe-Pantec) while CNP was measured in a subset of patients (n=16) by a specific radioimmunoassay (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA) after a preliminary solid phase extraction. All of the patients underwent nailfold capillary microscopy (Scopeman Pico-Charm View, Moritex, 200 x magnification), with a general description and a quantitative capillaroscopic score according to authoritative sources. Statistical analysis was made by non parametric tests and simple regression where appropriate.

Results. Plasma levels of NT-proCNP were significantly different between patients with primary Raynaud's phenomenon and patients with Raynaud's phenomenon associated with systemic sclerosis (p=0.04). Moreover, plasma levels of CNP were correlated to capillaroscopic score (R: 0.5 p = 0.03)

Conclusions. These preliminary results indicate that plasma levels of CNP rise in parallel with the severity of microangiopathy in Raynaud's phenomenon and that NT-pro CNP plasma levels are significantly higher in scleroderma patients in comparison with primary Raynaud's phenomenon, suggesting that these peptides may represent a valid aid in the early diagnosis of this challenging disorder.

References

Sudoh T, et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of the natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Comm.* 1990;168:863-70.

254

REALIZZAZIONE DI UN LABORATORIO ANALISI NELL'OSPEDALE DI HENINTSOA, VOHIPENO (MADAGASCAR)

V. Bianchi¹, G. Balza², C. Arfini³

¹S.O.C. Laboratorio Analisi

²S.O.C. Medicina Immunotrasfusionale

³Dip. Patologia Clinica Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo Alessandria

Introduzione. L'Ospedale Henintsoa (Vohipeno) è un piccolo presidio nel sudest del Madagascar della cui esistenza sono venuti a conoscenza un gruppo di ginecologi e chirurghi alessandrini. Poiché era stata allestita una sala operatoria si è sentita la necessità di un Laboratorio. Scopo di questa presentazione è illustrare come questo sia stato realizzato.

Materiali e metodi. Ospedale: costruito nel 2001 dai Padri Gesuiti, con fondi provenienti da un'associazione valdostana, ha 25 posti letto, sala operatoria, degenza, reparto di maternità, sala parto, laboratorio analisi, ambulatorio con ecografo e apparecchio tradizionale di radiologia.

Personale. Vi lavorano 6 sorelle (Suore Ospedaliere della Misericordia), 2 medici, 3 infermieri, 1 addetta alla lavanderia e 1 manutentore di impianti.

Risultati. La pianificazione è stata fatta in Italia sulla base del resoconto del primo viaggio dell'equipe medica mentre la realizzazione ha richiesto la presenza in loco.

Via container sono stati inviati attrezzature e consumabili di base, mentre l'Ordine ha provveduto all'acquisto di uno spettrofotometro a flusso con reattivi dedicati.

Il laboratorio è dotato anche di una piccola sala prelievi per i pazienti ambulatoriali. Vi opera una suora che oggi, formata ed addestrata, da sola è in grado di effettuare prelievi e analisi. Il repertorio di esami è ampio: substrati ed enzimi, coagulazione, conteggio globuli bianchi con formula, ematocrito, emoglobina, gruppo e fattore Rh, colorazione di Gram e ricerca trichomonas (tampone vaginale), esame urine e immunologico di gravidanza, esame feci per la ricerca di cisti, uova e parassiti, test di Emmel, VDRL, ricerca della Bilaziosi, Plasmodium, Salmonella, virus epatite C, B e HIV.

Conclusioni. Dopo la fase di realizzazione e la formazione in loco il Laboratorio ha continuato ad operare grazie alla continua e costante opera di consulenza a distanza.

La tenacia e la volontà della suora laboratorista è stata indispensabile per la riuscita del laboratorio di Henintsoa che oggi è autonomo, garantisce un servizio ottimo, soprattutto in termini di continuità. Per migliorare il pannello di esami eseguiti, è oggi prioritario l'acquisizione di un contaglobuli e l'approfondimento di esami parassitologici.