

001

IL CALCIO IONIZZATO CALCOLATO OTTENUTO NEL LABORATORIO CENTRALE COME VALIDA ALTERNATIVA AL POCT DEVICEA. Vaira¹, V. Brescia², R. Cardinali¹, A. Trentadue¹, D. Colucci¹¹U.O. Patologia Clinica Osp. "S. Giacomo", Monopoli²Patologia Clinica I Policlinico, Bari

Scopo del lavoro. Il calcio ionizzato (Ca^{2+}) rappresenta la frazione biologicamente attiva del calcio totale plasmatico sottoposta a regolazione omeostatica. Per la sua determinazione è raccomandato l'utilizzo del metodo potenziometrico mediante l'impiego di elettrodi ione-selettivi; tuttavia, la determinazione del Ca^{2+} con elettrodo selettivo su POCT è appropriata solo in Intensive Care Unit (NABC: EBM for POCT, 2006).

E' stato eseguito uno studio di correlazione tra la determinazione diretta del Ca^{2+} ottenuta mediante metodo potenziometrico, ed una valutazione indiretta del calcio ionizzato calcolato ($\text{c}[\text{Ca}^{2+}]$) basata sul valore della proteinemia e del calcio totale sierico.

Materiali e metodi. Lo studio è stato eseguito su 42 campioni di siero. Il Ca^{2+} è stato determinato con elettrodo ione-selettivo su POCT per emogasanalisi RAPIDPOINT (Siemens); il calcio totale ($\text{tot}[\text{Ca}]$) e le proteine totali sono stati determinati su analizzatore di chimica clinica DimensionRxl (Siemens); il $\text{c}[\text{Ca}^{2+}]$ è stato ottenuto mediante la formula di McLean&Hasting.

Il CV analitico è pari a 1.9% per Ca^{2+} , 2.9% per il $\text{tot}[\text{Ca}]$, e 2.2% per le proteine totali.

Risultati. Il valore medio del Ca^{2+} è risultato pari a 4.1 mg/dl (range 3.8-6.3 mg/dl), del $\text{tot}[\text{Ca}]$ a 9.0 mg/dl (range 7.5-11.1 mg/dl) e delle proteine totali sieriche a 6.6 g/dl (range 2.2-7.9). Il confronto tra Ca^{2+} e $\text{c}[\text{Ca}^{2+}]$ non ha evidenziato differenze significative (Paired t-test $P=.62$ F-test $P=.86$). Il bias tra il valore medio delle due concentrazioni è di 0.103+/-0.59. Lo studio di correlazione non ha evidenziato significative deviazioni dalla linearità ($P>0.10$ Cusum tests) ($R^2=0.92$ $\text{Ca}^{2+}=-0,480+1,130 \text{c}[\text{Ca}^{2+}]$).

Discussione e Conclusioni. I nostri risultati evidenziano come i metodi indiretti di determinazione del Ca^{2+} permettano un appropriato e corretto utilizzo del dato fornito dal laboratorio centrale.

002

SETTE EMOGASANALIZZATORI "GEM PREMIER 3000" OPERANTI COME POCT E MONITORATI DAL LABORATORIO CENTRALE MEDIANTE GEM-WEB:UNA RISPOSTA AI REQUISITI JCI PER LE ANALISI DECENTRATEB. Barbieri¹, A. Montanelli¹, F. Azzali²¹Lab. Analisi Cliniche, IRCCS Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI), Italy²Joint Commission International

L'Istituto Clinico Humanitas (ICH) è un IRCCS, riconosciuto dal Ministero della Salute e dalla Regione Lombardia, centro di eccellenza per la qualità dei servizi sanitari. Ha partecipato a diversi progetti sanitari della Comunità Europea e questa esperienza internazionale ha fatto maturare la volontà di certificare il modello di gestione dell'Istituto con l'accreditamento all'eccellenza di Joint Commission International (JCI) che è stato conseguito, prima esperienza in ambito nazionale, nel 2003 e riconfermato con modalità "tracer visit" nel 2006. JCI è un Ente autonomo americano per la certificazione delle strutture sanitarie che, attraverso verifiche ispettive, esegue una valutazione relativa alla sicurezza e qualità delle cure erogate in termini di risposta a standard predefiniti. In ICH sono installati 7 emogasanalizzatori "Gem Premier 3000 con iQM" (IL): uno in Laboratorio e 6 in altrettante Unità Critiche. Per i Point Of Care Testing (POCT) JCI richiede che siano documentate le procedure relative a: controlli di qualità, validazione metodiche diagnostiche, sorveglianza dell'operatività da parte del Laboratorio, azioni correttive intraprese, tracciabilità delle operazioni compiute per la produzione dei dati, tracciabilità dei risultati, verifiche tecniche degli strumenti, addestramento degli operatori. La soluzione tecnologica adottata, mediante la funzione iQM permette il controllo in continuo del sistema. Tutti gli strumenti vengono monitorati dal Laboratorio grazie al software GEM Web che permette di: visualizzare informazioni relative allo stato operativo dello strumento, abilitare/disabilitare parametri e/o strumenti, gestire le calibrazioni, visualizzare i report delle azioni correttive e le carte del controllo di qualità, inviare messaggi alle varie postazioni POCT, visualizzare e gestire i risultati delle analisi eseguite. Abbiamo così ottenuto i seguenti vantaggi: omogeneità strumentale e accuratezza diagnostica delle analisi ovunque eseguite; snellimento delle procedure; sicurezza in tutte le fasi del ciclo analitico. L'accreditamento JCI riconfermato nel 2006 testimonia la validità della soluzione adottata e l'ottima rispondenza agli standard richiesti.

Joint Commission International Accreditation Standards for Hospitals, 3rd edition

003

"IL WEB SERVICE": COME UNO SPOT

M. Nicoli¹, R. Mainardi¹, P. Rizzotti¹, E. Lattuada², C. Colombo², P. Da Tos²

¹Lab. di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche O.C.M., Verona

²Instrumentation Laboratory, Milano

Scopo. "Il web senza confini", ripete uno spot pubblicitario di una importante azienda di telefonia mobile.

Il servizio Web Service della Instrumentation Laboratory (IL) ha allargato i confini dell'assistenza tecnica applicativa e di consulenza. Non più il tecnico del service o lo specialist di prodotto in laboratorio, ma una web-cam ed un connesione web dallo strumento per avere una assistenza e consulenza "senza confini".

Il nostro Laboratorio ha attivato il Servizio Web IL per tre ACLTop nel luglio 2007.

Metodologia. Connettività nel rispetto degli standard di sicurezza, sessioni su web criptate a 128 bit (SSL) con password di accesso multilivello generate in modalità randomica. Ogni sessione può essere avviata solo con esplicito consenso del laboratorio. Ogni sessione viene registrata e archiviata. Le sessioni di lavoro sono programmate in prevenzione ogni inizio mese e possono essere attivate per necessità in qualsiasi momento durante l'orario di lavoro. Modalità di collegamento: Il Laboratorio contatta l' Help Line. Viene attivato il collegamento al sito web www.il-italia.it. Si avvia la sessione tramite un codice di accesso criptato e univoco. Verificata l'autenticità del collegamento, il Laboratorio autorizza il trasferimento dello schermo e controllo dello strumento.

Risultati. Attività del "Service IL" per 12 mesi prima dell'attivazione del servizio.

Manutenzione preventiva: n. 4 (8%), Riparazione n. 16 (32%), Supporto telefonico n. 30 (60%).

Attività del "Service IL" per 13 mesi dopo l'attivazione del servizio.

Manutenzione preventiva: n. 5 (6%), Riparazione n. 10 (13%), Supporto telefonico n. 60 (77%), Interventi di prevenzione n. 3 (4%).

Considerazioni. I dati riportati evidenziano una drastica riduzione dei fermo macchina (dal 32% al 13%).

I "confini" di utilizzo del Web Service IL possono essere riassunti: Prevenzione. Monitoraggio costante del sistema tramite appuntamenti periodici con Help Line per prevenire possibili criticità. Supporto tecnico. Individuazione dettagliata della natura del guasto. Supporto applicativo. Analisi di casi e dati con l'intervento diretto dello specialista Help Line. Supporto formativo. Formazione e supporto anche per personale meno esperto Comunicazione. Utilizzo della webcam come umanizzazione del rapporto e migliore relazione.

004

TURN AROUND TIME DI UN SISTEMA DI AUTOMAZIONE PER IL LABORATORIO ANALISI

D.M. Alessio¹, C.A. Ferrero¹, L. Germagnoli¹, M. Pontillo¹, F. Ceriotti¹

¹Lab., Dip. di Medicina di Laboratorio, Osp. San Raffaele, Milano

Dal settembre 2004 stiamo utilizzando un sistema di automazione per l'area siero. Tale progetto è stato sviluppato attraverso la collaborazione tra la società Inpeco e Laboraf (Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano).

Il sistema è aperto e permette la connessione di 13 analizzatori: Tosoh (3 Aia 1800), Siemens (3 Advia 2400 e 1 Advia Centaur), Abbott (2 Architect i2000) e Diasorin (4 Liaison).

I parametri analizzati sono 133 e spaziano dalla chimica clinica, sierologia, marcatori cardiaci alla immunochimica, rappresentando circa il 90% dei test eseguibili su tale matrice.

In media vengono processate circa 2.700 provette/die gestite completamente in automazione.

Possiamo definire come Turn Around Time Automation (T.A.T. Automation) il tempo speso da un sistema di automazione di laboratorio per gestire il campione dall'inizio alla fine del processo. In particolare, attraverso la workcell FlexLab, si riesce ad ottenere un management totale: check-in, fase preanalitica (centrifugazione e stappatura), analitica, ritappatura e stoccaggio.

Da un monitoraggio eseguito sul 90% delle provette processate mensilmente, in 8 mesi, siamo riusciti a ridurre del 32% (gennaio 07 – giugno 08) il T.A.T. Automation ed a stabilizzarlo mediamente a 37 minuti nonostante un aumento della routine pari al 68% (gennaio 07 – giugno 08). Tale risultato è stato ottenuto attraverso un adeguamento hardware della workcell e un affinamento della gestione tecnica del processo in tutte le fasi coinvolte. Per ritenere concluso il campione, occorre aggiungere il tempo di rilascio dei risultati che oscilla tra i 10 minuti della chimica clinica ed un massimo di 46 per la sierologia.

Analizzando nel dettaglio la distribuzione delle frequenze [giugno: 52.500 provette monitorate] emerge che il 91% dei campioni viene gestito entro i 60 minuti. Questo ci offre la possibilità di trattare la routine con T.A.T. confrontabili a quelli dei campioni richiesti in urgenza.

L'elevato livello di gestione dei dati, la completa tracciabilità dei processi interni, un'archiviazione sicura ed un facile recupero dei campioni riducono i tempi di produzione referto permettendo un più tempestivo intervento clinico.

005

CONSOLIDATION AND INTEGRATION: S. MARINO HOSPITAL LABORATORY EXPERIENCE

F. Casali¹, G.F. Fantini¹, S. Manoni¹, F. Nocentini¹, F. Muccioli¹, U. Turchi¹, A. Zani¹, L. Zanotti¹

¹Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Stato della Repubblica di San Marino

Background. The Republic of San Marino is a 36.000 inhabitant little Republic (61 kmq), completely surrounded by Italian Regions Emilia-Romagna and Marche. The "Istituto per la Sicurezza Sociale" (ISS) local public health Institution, was created in 1959 (Law n.10 - Mar 9th); at present, it is organized into six departments. The Clinical Pathology Laboratory, that is part of the Services Department, is located inside the Hospital building. Its activity in year 2007 can be resumed in 945.818 tests performed, 824.459 total reports of which 50.178 on external accesses and 28.171 on internal.

S.Marino health service is completely free.

Aim of the Study. To describe the Clinical Pathology Laboratory workflow revision realized in function of guidelines issued by ISS according to new local laws.

Materials and Methods. Subsequently to new multi-year Sanitary Plan issued by Authority was undertaken a consolidation and integration process that lead to a new workflow organization. The laboratory has two main operative lines: one grouping Clinical Chemistry (CC), Hematology and Cytology Operative Units (OUs), the other with Microbiology and Immunoassays (IA) OUs and Transfusion Centre. The major goals were: to integrate STAT testing, improving safety, reduce costs and to develop new activities, moving toward integrated systems like UniCel DxI 880i and 600i for CC and IA testing (Beckman Coulter).

Results and discussion. The consolidation and integration of routine and STAT testing for both CC and IA testing resulted in: 1) safety improvement due to Closed Tube Aliquoter and Closed Tube Sampling analyzers adoption, avoiding potentially biohazardous microparticles spreading and other occupational hazards; 2) costs lowering due to primary tubes number reduction and elimination of underused analyzers for Ammonia, Lithium and some drugs; 3) time saving as a consequence of elimination of decapping and aliquoting operations and reduction of blood drawings; 4) human resources free for new activities requested by new sanitary plan such as cytology and Human Papilloma Virus screening; 5) quality improvement.

Conclusions. Although detailed costs analysis and Turn Around Time (TAT) analysis are still ongoing, the quality indicators are satisfying, suggesting that the reorganization process allowed the laboratory to fulfill the objectives requested by new S. Marino Sanitary Plan.

006

PRATO'S PRESIDIO OSPEDALIERO MISERICORDIA E DOLCE: LABORATORY ANALYSIS REORGANIZATION EXPERIENCE

P. Casprini¹, M. Rispoli¹, A. Ruggeri¹

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, Ospedale Misericordia e Dolce, Prato

Background. Presidio Ospedaliero Misericordia e Dolce laboratory analysis performed in 2007 4070,000 tests/year, 45% on in-patients and 55% on out-patients. Out-patients activity is guaranteed from 17 withdraw points, in-patients from an internal one. Laboratory's organization is per sectors.

2002 activity was 2600,000 tests, so, after the growth to the actual volume, a reorganization was mandatory. Main aspects were information technology, automation and specialty tests optimization. In 2005 a reorganization with preanalytical automation took place for Endocrinology/Pharmacology, Hematology and Coagulation.

In 2006 serum area tender was performed for biochemistry, cardiac and serology (previously consolidated from Transfusional department) testing.

Aim of the Study. Evaluate the success of Prato laboratory's automated corelab with real metrics.

Materials and Methods. Equipment: Power Processor, double centrifuge, aliquoter, three biochemistry (DxC800) and two immunoassay (Dxl800) analyzers linked, stockyard (Beckman Coulter).

Agreement with tender requests, Turn Around Time (TAT) and costs evaluation.

Results and discussion. Serum area corelab consolidated biochemistry, cardiac and serology markers routine and emergency requests on 5 analyzers, integrated in preanalytical automation system. Integrated aliquoter generates aliquots for foresis, nephelometry, serology stocks and Bence-Jones.

Human resources (FTE, full time equivalent; T= technician, D=degree) are working on four shifts: 8 am-2 pm, 3 T and 1D; 10 am-4 pm 1T; 2 pm-8 pm, 2T and 1D; 8 pm-8 am, 2T.

Workflow: mean 1100 tubes (min 172, max 1350); mean 7.559 tests (6069 routine, 1490 emergency); 500 aliquots generated/day.

Total TAT emergency 27min, routine 70min; Power Processor TAT Troponin 44min, Glucose 22min (centrifugation included). From 10 am to 1 pm (activity peak), some technicians are still working manually: without centrifugation time (XX min) TAT Troponin 38min, Glucose 12min. Economical impact: 0,38 euro/test saved (mean cost=global costs/tests number), considering 4 FTE retired and not substituted.

Conclusions. Automated corelab is working routinely from March 2007 with good performances. Main reorganizational objectives were reached, with complete satisfaction due to achieving economical goal also.

007

VALUTAZIONE ANALITICA E ORGANIZZATIVA DEL COBAS 6000 ROCHE IN UN LABORATORIO URGENZE

D. Scribano¹, S. Di Leva¹, T. De Michele¹, L. Colacicco¹, B. Giardina¹, C. Zuppi¹

¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Background. Il Cobas 6000 e' un sistema integrato di moduli di chimica e di immunochimica con circa 150 metodiche che utilizzano reagenti liquidi e pronti all'uso. Per le sue caratteristiche il Cobas 6000 sembra particolarmente adatto ad un Laboratorio Urgenze come il nostro (circa 300 richieste/die, media di 8 tests per richiesta).

Scopo del nostro lavoro e' stato valutare e confrontare la performance organizzativa dell'impianto analitico attuale (Sistema A), in confronto con una soluzione organizzativa che prevede esclusivamente il Cobas 6000 (Sistema B). Nella valutazione particolare attenzione è stata attribuita al TAT e all'impegno lavorativo del tecnico.

Materiali e metodi. Il pannello degli esami urgenti, concordato con il Comitato dei Clinici, comprende: glicemia, BUN, sodio, potassio, calcio, bilirubina totale e diretta, AST, ALT, PCHE, LDH e CPK per quanto riguarda la chimica; troponina I, CK-MB e mioglobina per gli esami immunometrici.

Abbiamo analizzato sia a piccoli gruppi che singolarmente, 550 campioni con soli tests di chimica e 450 campioni con tests sia di chimica che di immunochimica sul Sistema A (AU640 Olympus e Cobas 411 Roche) e sul Sistema B (Cobas 6000 Roche). Per ogni campione e' stato calcolato il TAT.

Risultati. Le caratteristiche analitiche dei due strumenti sono sovrapponibili, così come la stabilità delle calibrazioni. I CV%, inter e intradays, per i parametri di chimica sono compresi tra 1 e 3% e tra il 3 e 7 % quelli di immunochimica, per ambedue i sistemi.

I maggiori vantaggi del sistema B sono: la riduzione della strumentazione con riduzione delle incombenze tecniche, la semplificazione della gestione anche informatica, la riduzione della mobilità delle provette con un flusso di lavoro più snello, la disponibilità dei reagenti in cassette del Cobas 6000, che assicura una minore possibilità di errore. I TAT calcolati in diverse condizioni (campioni lavorati singolarmente o in batch), soprattutto per i campioni con tests di chimica e immunochimica, sono molto più brevi nel Sistema A (circa 18').

Conclusioni. Riteniamo che il Cobas 6000, in rapporto alle sue peculiari caratteristiche, permetterebbe di ottimizzare il servizio, ma che la mancata adozione di metodiche immunochimiche a tempo di incubazione di 9 minuti, più compatibili con un TAT di analisi urgenti, possa inficiare l'inserimento del Cobas 6000 in un servizio urgenze.

008

ANALISI DELLE NON CONFORMITÀ NELLA FASE PRE ANALITICA ED AZIONI CORRETTIVE. SPERIMENTAZIONE DELLA STRUMENTAZIONE Lab.E.L. (PROGETTO PILOTA)

D. Vandini¹, G. Bianchi¹, V. Epifani¹, P. Giampaoli¹, E. Pazzaglia¹, O. Stocchi¹, C. Zaccari¹

¹U.O. Lab. Analisi Ospedale di Urbino, ASUR Marche, Zona Territoriale 2, Urbino

Introduzione. Nella fase pre analitica si hanno due attività chiave: formulazione del quesito clinico con scelta dei test appropriati; accettazione, raccolta e prelievo dei campioni. Fondamentale è la corretta identificazione del paziente, la cui misidentificazione ha ovviamente gravi conseguenze. Scopo del lavoro: Ridurre gli errori che si verificano nella fase pre analitica.

Metodologia. Registrazione delle non conformità (NC) riguardanti la fase pre analitica dei prelievi di pazienti degenti. Elaborazione dati, con uso di istogrammi e diagramma di Pareto.

NC più frequenti: campione emolizzato, coagulato, non a volume, non conservato idoneamente, anagrafica incompleta, scheda di richiesta mal compilata.

Azioni correttive (AC). formazione del personale coinvolto nell'esecuzione del prelievo (corsi ECM); stesura di un manuale con le modalità di prelievo dei campioni; referenziazione non automatica degli analiti con interferenti (indici di siero per emolisi, ittero e lipemia); stesura di nuove schede per richiesta esami; installazione sperimentale di Lab.E.L. (EOS-BD): strumentazione che al momento dell'accettazione, automaticamente predispone le provette appropriate già etichettate, raccolte in apposito "box" chiuso superiormente da un'etichetta barcodata con i dati identificativi del paziente (anagrafica, numero e data di accettazione, reparto).

Le AC apportate hanno consentito di ridurre alcune NC. L'introduzione della strumentazione Lab.E.L. ha garantito la corretta identificazione positiva dei pazienti e la corretta modalità di raccolta e di uso delle provette. Inoltre ha permesso, sia per i pazienti ricoverati che per gli esterni, di preparare kit sigillati che, se aperti al momento del prelievo dal personale infermieristico, diminuiscono molto il rischio di mis-match tra provette. Il conseguente arrivo di provette già barcodate dai reparti ha consentito di velocizzare il flusso di lavoro nei settori analitici, con reciproco beneficio tra operatori di reparti diversi, nonché un maggiore controllo delle fasi preanalitiche svolte al di fuori delle mura del Laboratorio, che possono inficiare il raggiungimento di una elevata qualità analitica.

Bibliografia

Burnett D, Plebani M. Guida pratica all'accreditamento dei Laboratori Clinici, 2003.

009

DETERMINAZIONE DEGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO DELLA CREATININA PLASMATICA IN UNA POPOLAZIONE ADULTA E SENILE

N. Venturi¹, C. Ballabio¹, V. Proserpio¹, M. Beretta¹, R. Falbo¹, E. La Valle¹, P. Mocarelli¹, P. Brambilla¹

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

Introduzione. L'introduzione nel nostro laboratorio di un metodo tracciabile con il metodo di riferimento GC-IDMS per la determinazione della creatininemia ha richiesto la rivalutazione degli intervalli di riferimento per la creatinina plasmatica (pCRE). In questo studio abbiamo studiato gli intervalli di riferimento età/sex correlati, mediante l'estrazione dal database DMDL (Data Mining Desio Laboratory) del nostro laboratorio dei dati relativi alle determinazioni della pCRE effettuate tra giugno 2005 e giugno 2008.

Materiali e metodi. Le misurazioni della pCRE sono state eseguite su MODULAR SWA (Roche, Mannheim, Germany) con il metodo di Jaffè cinetico compensato tracciabile con il metodo di riferimento GC-IDMS. Sono stati selezionati 30.072 soggetti (13.235 maschi e 16.837 femmine) che nel periodo considerato avevano eseguito la determinazione della pCRE una sola volta, così da limitare la presenza di soggetti affetti da patologie. Per l'analisi statistica è stato utilizzato un metodo non parametrico secondo le indicazioni fornite dal Clinical and Laboratory Standards Institute.

Risultati. La popolazione selezionata, dopo l'esclusione dei dati aberranti, risultava costituita da 27.144 soggetti (12.050 maschi e 15.094 femmine).

Le mediane dei valori di pCRE calcolate per ogni singolo anno mostrano che i valori di pCRE restano costanti fino ai 64 anni per i maschi e fino a 61 anni per le femmine, mentre aumentano leggermente nelle fasce d'età superiori.

Gli intervalli di riferimento riscontrati sono rispettivamente: 0,67 – 1,16 mg/dL; 0,65 – 1,24 mg/dL e 0,66 – 1,38 mg/dL per le tre classi d'età dei maschi (19 - 64 anni, 65 – 69 anni e 70 – 76 anni). I valori di riferimento per le femmine sono: 0,48 – 0,91 mg/dL; 0,52 – 0,89 mg/dL e 0,50 – 1,1 mg/dL per le tre classi d'età (19 - 61 anni, 62 – 72 anni e 73 – 78 anni).

Conclusioni. I dati trovati sono in accordo con quelli riportati da Pottel nel lavoro che valuta gli intervalli di riferimento per la pCRE misurata con un metodo tracciabile GC-IDMS.

Bibliografia

1. Clinical and Laboratory Standards Institute document C28-P3 2008;28(11)May 26.
2. Pottel H et al. Clin Chim Acta 23 Jun 2008; article e – published.

010

DETERMINAZIONE DEGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO ETÀ/SESSO CORRELATI DELLA CREATININA PLASMATICA IN UNA POPOLAZIONE PEDIATRICA

N. Venturi¹, C. Ballabio¹, R. Falbo¹, E. La Valle¹, P. Mocarelli¹, P. Brambilla¹

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

Introduzione. La determinazione degli intervalli di riferimento per la creatinina plasmatica (pCRE) è particolarmente rilevante per la popolazione pediatrica per la quale la formula "Modification of Diet in Renal Disease" (MDRD) non è validata. In questo studio abbiamo stabilito gli intervalli di riferimento età/sex correlati, mediante l'estrazione dal database DMDL (Data Mining Desio Laboratory) del nostro laboratorio dei dati relativi alle determinazioni della pCRE effettuate tra giugno 2005 e giugno 2008 in soggetti di età compresa tra 0 e 18 anni.

Materiali e metodi. Le misurazioni della pCRE sono state eseguite su MODULAR SWA (Roche) con il metodo di riferimento GC-IDMS. Sono stati selezionati soggetti che nel periodo considerato avevano eseguito la determinazione della pCRE una sola volta, così da limitare la presenza di soggetti affetti da patologie. Per l'analisi statistica è stato utilizzato un metodo non parametrico secondo le indicazioni fornite dal Clinical and Laboratory Standards Institute.

Risultati. La popolazione selezionata, costituita da 2.895 soggetti (1.421 maschi e 1.474 femmine), è stata stratificata in base a sesso ed età scelte così da assicurare un minimo di 120 misurazioni per classe d'età come raccomandato da Reed et al.

I valori della pCRE sono diversi per classi d'età. Gli intervalli di riferimento non mostrano differenze statisticamente significative per maschi e femmine tra 0 e 14 anni (classe 0 – 2 anni: 0,15 - 0,39 (mg/dL), classe 3 – 5 anni: 0,23 - 0,51 (mg/dL), classe 6 – 8 anni: 0,31 - 0,58 (mg/dL), classe 9 – 11 anni: 0,38 - 0,71 (mg/dL), classe 12 – 14 anni: 0,43 - 0,87 (mg/dL). I valori di riferimento differiscono tra i 15 e i 18 anni; per i maschi sono, per la classe 15 – 16 anni: 0,56 – 1,065 (mg/dL), per la classe 17 – 18 anni: 0,62 – 1,1 (mg/dL). Per le femmine, l'intervallo per la classe 15 – 16 anni è 0,51 – 0,91 (mg/dL), quello per la classe 17 – 18 anni: 0,50 – 0,91 (mg/dL).

Conclusioni. I risultati ottenuti trovano corrispondenza con quelli dell'unico lavoro presente in letteratura che valuta nella popolazione pediatrica gli intervalli di riferimento per la pCRE misurata con metodo GC-IDMS tracciabile.

Bibliografia

1. Clinical and Laboratory Standards Institute document C28-P3 2008;25(11):26.

011

INFLUENCE OF HEMOLYSIS ON ROUTINE LABORATORY CARDIAC MARKERS

M. Daves¹, G.L. Salvagno², M. Montagnana², G. Brocco², R. Cemin³, F. Dima², G.C. Guidi², G. Lippi²

¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano, Bolzano, Italy

²Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Verona, Italy

³Divisione di Cardiologia, Azienda Sanitaria di Bolzano, Bolzano, Italy

Background. Preanalytical factors, including haemolytic specimens, are the main source of variability in laboratory testing. However, reliable information on the potential bias arising from in vitro hemolysis on conventional biomarkers of cardiac damage is lacking. Methods. Three aliquots, prepared by serial dilutions of homologous hemolyzed samples collected from 14 different subjects and containing final concentrations of serum hemoglobin of 0 g/L, 0.3 g/L and 0.6 g/L, were tested. The concentrations of cardiac troponin I and T (TnI, TnT), myoglobin, creatine kinase isoenzyme-MB (CK-MB), brain natriuretic peptide (BNP), NT-prohormone-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) were assayed on the Modular E analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and on the Access 2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Differences between samples were evaluated by paired Student t test and the plasma sample without free hemoglobin was chosen as the reference sample. Results are expressed as geometric mean \pm standard error of the mean. Results. No significant differences were observed for any of the analyte tested (0; 0.3; 0.6 g/L free hemoglobin): myoglobin (100 \pm 81 mg/L; 102 \pm 81 mg/L, p=0.10; 102 \pm 83 mg/L, p=0.44), TnI (0.4 \pm 6.17 ng/mL; 0.44 \pm 6.51 ng/mL, p=0.10; 0.44 \pm 6.38 ng/mL, p=0.47), CK-MB (Access 2) (2.20 \pm 8.33 ng/mL; 2.26 \pm 8.60 ng/mL, p=0.16; 2.27 \pm 8.48 ng/mL, p=0.48), CK-MB (Modular E) (4.71 \pm 6.67; 4.66 \pm 6.81, p=0.21; 4.62 \pm 6.67 ng/mL, p=0.49), BNP (157 \pm 480 pg/mL; 156 \pm 481 pg/mL, p=0.15; 154 \pm 474 pg/mL, p=0.17), TnT (0.015 \pm 0.62 ng/mL; 0.15 \pm 0.63 ng/mL, p=0.05; 0.015 \pm 0.62 ng/mL, p=0.45) and NT-proBNP (1169 \pm 2629 pg/mL; 1160 \pm 2627 pg/mL, p=0.30; 1180 \pm 2661 pg/mL, p=0.11). No clinically meaningful variations, as reflected by percentage deviation from the quality specifications for desirable bias, were also observed for any of the analytes. Conclusion. The results of our investigation confirm that a moderate blood cell lysis, as low as 0.3-0.6 g/L, has no influence on results reliability of conventional biomarkers of cardiac damage on the Modular system E and on the Access 2. In the assay conditions tested, mildly haemolytic specimens can be processed without further triage.

012

PLANNING AND IMPLEMENTATION OF AN AREA LABORATORY IN MODENA DISTRICT: ROLE OF CHIEF TECHNICIANS BOTH IN PERFORMANCE AND HUMAN MANAGEMENT OUTCOME

G.P. Medici¹, G. Righi¹, E. Bellei¹, P. Paolini¹, L. Veroni¹, D. Gherardi¹, G. Guerreschi¹

¹Dip. Patologia Clinica, Nuovo Ospedale S. Agostino-Estenze, Modena

Modena area Health System until 2005 consisted of 9 local hospitals with 7 Clinical Pathology laboratories providing diagnostic services to them. A new area hospital (approximately 600 beds) started its activity in June 2005, also the Clinical Pathology system has been re-organized. Now a new area laboratory is serving all Modena area (in and out hospital patients), with 3 local-hospital laboratories and 28 points of care, all dealing only with emergency and hot tests. The area laboratory consists of a Clinical-Pathology Core Lab dealing with automated plus traditional off line activities and a new Clinical Pathology area where new specialized activities are under development. Consequently 4 laboratories were closed and all technicians were positioned in the new laboratory together with others coming from the 3 hot laboratories, as a result of the reduced workload. The chief technicians were in charge of defining the new laboratory people employment on department basis changing the organization, previously based on single laboratory units, to an integrated area service network.

The aim of this work is to evaluate laboratory efficiency together with the agreement of technicians in terms of working quality perception after re-organization.

On department basis the following results seem worthy of interest: a. the tests performed in 2004 were 7.926.339 with an activity valorisation of 25.124.750 euro, in 2007 the test were 9.151.327 with a valorisation of 31.949.111 (+22%), b. at present the total number of technicians is the same compared to that in 2004, c. technician workforce has been reduced in the Core Lab (-25%) even with a much higher test volume (+22%) and d. technician workforce has been retrained for the development of more specialised activities. A survey (55 anonymously technicians, 27 items) about technicians' satisfaction demonstrated that 20% was highly satisfied, 64% satisfied of new working conditions. Only 16 % was unsatisfied and nobody highly unsatisfied, similar results were obtained with regard to professional activities.

In conclusion there are new professional skills together a high level of satisfaction among the technicians that find the conditions in new lab better than the previous ones. This points out the role of chief technicians both in performance and human resources management.

013

ORGANIZZAZIONE DEL LABORATORIO: IL CONTRIBUTO DELL'AUTOMAZIONE NELLA FASE PRE-ANALITICA DEL PROCESSO DI ANALISI DEL CAMPIONE

P. Bonelli¹, R. Rossi¹, E. Bonilauri¹, C. Monica¹

¹Lab. Diagnostica Ematochimica, Dip. Patologia e Medicina di Lab., Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

Scopo. Verificare se e quanto l'automazione completa della Sezione Accettazione abbia consentito non solo di velocizzare questa fase di lavoro, ma anche di garantire una migliore tracciabilità dei campioni, un controllo sulla fase pre-analitica ed una ottimizzazione delle risorse umane disponibili.

Metodo. Il laboratorio dispone di cinque piattaforme automatizzate front-end con caricamento continuo: tre AutoMate 800 (Beckman), un PowerProcessor (Beckman) ed un Pathfinder (Medical Systems). Nel nostro Laboratorio tutta la strumentazione di pre-analitica è collocata in un'unica area, comprensiva anche di zona centrifughe. Nella Sezione Accettazione operano un dirigente biologo e 13 preparatori. Il processo pre-analitico, per l'immunometria, è svolto solo in parte dall'Accettazione in quanto i campioni, dopo centrifugazione, vengono caricati sul Pathfinder dal personale della Sezione Immunometria.

Carico di lavoro provette: 5500-6000/die di cui 70% da centrifugare.

Il numero giornaliero di provette figlie è di 1300-1500 per Immunometria; 300-400 per Elettroforesi; 250-300 per Autoimmunità; 30-40 per Farmaci; 20-40 per Allergologia.

Lo smistamento automatizzato risponde ai seguenti criteri:

Sezione Chimica: su stativi generici in cui i campioni vengono collocati stappati; Sezione Coagulazione: i campioni vengono collocati stappati, direttamente su portaprovette degli strumenti ACLtop; Sezione Farmaci: i campioni vengono posti in uno stativo generico nelle tre possibili situazioni: con tappo, senza tappo, aliquotati. Le aliquote prodotte per Elettroforesi, Allergologia ed Autoimmunità sono sistemate in stativi generici opportunamente identificati.

Gli emocromi sono processati dal PowerProcessor che non dispone di centrifughe.

Risultati. La gestione automatizzata dell'Accettazione del Laboratorio ha consolidato i processi pre-analitici migliorando la tracciabilità e ottimizzando le risorse disponibili.

Conclusioni. I benefici ottenuti dall'implementazione dell'automazione sono consistiti nella gestione in continuo del caricamento dei campioni sugli strumenti, che risente delle ampie fluttuazioni nell'arrivo dei campioni durante la mattinata e nella possibilità di ridurre il numero di tubi grazie ad un processo di consolidamento di più esami su provetta unica.

014

RIORGANIZZAZIONE DELLE GRANDI LINEE ANALITICHE DEL DIPARTIMENTO ASSISTENZIALE DI MEDICINA DI LABORATORIO (DASME LAB) DELL'AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA (AOU) FEDERICO II: RISULTATI PRELIMINARI

I. Pascucci¹, F. Gaeta², A.T. Scialla², A. Dello Russo¹

¹Dip. Assist. di MedLab Az. Osp. Univers. Federico II & Corso Laurea Spec. Scienze Sanit. Tecniche-Diagnostiche, Università degli Studi di Napoli

²Corso di Laurea Specialistica in Scienze Sanitarie Tecniche-Diagnostiche, Università degli Studi di Napoli

L'aumento dei costi della Sanità, la normativa vigente e lo sviluppo tecnologico costituiscono una forte spinta alla riorganizzazione della Medicina di Laboratorio attraverso percorsi progressivi e/o trasformazioni radicali.

Nell'AOU "Federico II" l'organizzazione dei laboratori del DASMeLab fino al mese di Giugno 2007 prevedeva due linee analitiche: routine ed urgenze, ognuna con dotazione di personale e strumentazioni. Dal mese di luglio 2007 le due linee sono state unificate in via sperimentale in fascia oraria 8,00-14,00; i campioni sono stati accettati e processati tutti sulla strumentazione della linea routine, indipendentemente dalla tipologia della richiesta.

L'obiettivo del lavoro è quello di verificare se tale riorganizzazione ha apportato miglioramenti in termini di efficacia, efficienza e controllo della spesa.

Sono stati comparati, mediante rilevazione statistica, i dati relativi alla III settimana di Giugno 2007 ed i dati relativi alla III settimana di Luglio 2007 (prima e dopo l'unificazione).

Tali dati sono stati reperiti nelle due strutture (routine e urgenze) in due sistemi informatici differenti e, quindi, rielaborati in un nuovo data base, costruito ad hoc in Access. I risultati ottenuti hanno evidenziato che:

1. nella III settimana di Giugno 2007 il 100% dei campioni a carattere di urgenza sono stati processati alla linea urgenze;
2. nella III settimana di Luglio 2007 invece, il 43,2% dei campioni urgenti sono stati processati alla linea routine;
3. nella III settimana di Giugno sono state riscontrate richieste inviate contemporaneamente alle due linee analitiche; ciò non si è verificato nella III settimana di Luglio;
4. la riorganizzazione ha permesso ad una unità di personale laureato e a due unità di personale tecnico di essere inserite in altre aree;

5. sono state ottimizzate le risorse economiche con la messa in stand-by delle strumentazioni e l'utilizzo degli stessi reagenti per un maggior numero di determinazioni. Possiamo concludere che l'unificazione di linee analitiche ha comportato una effettiva ottimizzazione delle risorse umane ed economiche ed il miglioramento dell'efficienza del laboratorio.

Bibliografia

Gardini A. Verso la qualità. Centro Scientifico Editore 2007.

Delibera n.1246 della Regione Campania, BURC n. 46 del 20 Agosto 2007.

015

RELATIONSHIP BETWEEN MYOCARDIAL BIOCHEMICAL MARKERS AND REGIONAL CONTRACTILE DYSFUNCTION IN MINIPIGS WITH LEFT VENTRICULAR PACING-INDUCED HEART FAILURE

T. Prescimone¹, C. Colotti², C. Caselli², M. Cabiati², S. Del Ry¹, V. Lionetti², M. Emdin¹, F. Recchia², D. Giannessi¹

¹CNR-Institute of Clinical Physiology, Fondazione Gabriele Monasterio, Pisa, Italy

²Scuola Superiore S. Anna, Pisa, Italy

Purpose. Left ventricle (LV) dilatation and myocardial remodeling as well as regional differences in contractile function are thought to contribute to pathophysiology of heart failure (HF). In this study the relationship between regional contractile dysfunction and the levels of biomarkers of extra-cellular matrix remodeling was assessed by measuring mRNA expression of Osteopontin (OPN), Matrix Metalloprotease (MMP)-2 and -9 and of their inhibitors, TIMP-1 and -2, in LV sample.

Methods. Five adult male minipigs were chronically instrumented with an unipolar pacemaker connected to the epicardial surface of the LV anterior wall (pacing site) to induce HF by rapid LV pacing (180 beats/min). End-stage HF occurred at 21±2 days of pacing (LV end-diastolic pressure 320 mmHg). As control, 5 healthy adult male minipigs were studied. Regional changes in end-systolic wall thickening, a regional index of LV contractility, and wall stress were assessed by MRI. MMP and TIMP mRNA expression were determined by RT-PCR in samples collected from LV pacing site.

Results. After 21 days of pacing, EF% was 24.0±3.7 (mean±sem) vs 70.8±3.7 at baseline (p<0.001). A significant decrease in LV end-systolic wall thickening was found in the pacing site (p=0.022), while LV end-systolic wall stress was significantly increased in all cardiac regions, in absence of gadolinium delayed contrast-enhancement, an index of fibrosis. OPN was significantly higher in HF than in controls (OPN: 0.46±0.12 vs 0.099±0.03, p=0.019). Similarly, MMP-9 expression was significantly increased as well as the inhibitor TIMP-1 (MMP-9: 0.28±0.078 vs 0.082±0.018, p=0.025; TIMP-1: 0.98±0.20 vs 0.064±0.02, p=0.002). MMP-2 expression was 0.19±0.03 in HF vs 0.087±0.015 at baseline, p=0.016 and TIMP-2 was 0.79±0.07 vs 0.54±0.12.

Conclusions. Our findings indicate that remodeling mediators and related inhibitors are both up-regulated in failing myocardium. The balance between proteolysis/anti-proteolysis is in tune with the absence of gadolinium delayed contrast-enhancement.

Reference

Lionetti V, Guiducci L, Simioniu A, et al. Mismatch between uniform increase in cardiac glucose uptake and regional contractile dysfunction in pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2747-56.

016

GENETIC TESTING FOR FACTORS II, V AND MTHFR (677 AND 1298): AN IN- AND OUT-PATIENTS ANALYSIS

Torre¹, O. De Luca¹, L. Aimati¹, M. Borro¹, G. Gentile¹, A. Provenza¹, L. Lionetto¹, M. Lostia¹, M.E. Lamioni¹, M. Simmaco¹

¹Dipartimento Scienze Biochimiche, UO Diagnostica Molecolare Avanzata (DIMA), II Facoltà di Medicina, Università La Sapienza, Roma

Background and Aim. Inherited thrombophilia is part of multicausal thrombotic diseases due to genetic and environmental risk factors. To describe the frequency of four inherited thrombophilias and their combination in a group of in- and out-patients referred during 12 months to the molecular advanced diagnostic unit of S. Andrea Hospital in Rome.

Materials and Methods. A total of 852 cases were analyzed of which 157 were in-patients (InP) (89F; 68M); mean age 48±19 years. 608 were general out-patients (GoP) (518F; 90M); mean age 44±21 and 80 were out-patients (ToP) (38F; 42M), mean age 54±9 years, assuming oral anticoagulants for a previous vascular thrombotic event or to prevent it. For each patient DNA was extract from 250 µl of EDTA whole blood. 50-150 ng of DNA was used in a Real-Time PCR FRET system (Rotor-Gene 3000, Corbett Research), melting temperature was performed for each polymorphism analyzed.

Results. Factor II analysis showed the same amount of heterozygous 7%, either in InP, GoP or ToP with no homozygous. Factor V showed 5% heterozygous in InP with no homozygous; n. 38 (6%) (31F e 7M) of heterozygous with 3 (0,5 %) cases of homozygous in GoP and 22% of heterozygous with 1,2% of homozygous in ToP. MTHFR-677 was heterozygous in 51%, 50% and 35%, while resulted homozygous in 20%, 23% and 27% of InP, GoP and ToP respectively. MTHFR-1298 was heterozygous in 46%, 41% and 39%, while resulted homozygous in 11%, 10% and 9% of InP, GoP and ToP respectively. Only factor V heterozygous was statistically higher in ToP compared to InP and GoP. However, heterozygous MTHFR 677 was less present in ToP than in the other groups of patients. When the Hardy-Weinberg formula was applied, the ToP showed to have an higher allelic frequencies of all the analyzed polymorphisms that reached statistic significance with factor II and factor V.

Conclusions. The present analysis shows that genomic tests for inherited thrombophilia represent an important diagnostic tool to understand previous thrombotic diseases and a valid and appropriate method to screen at risk patients. Increased knowledge on genotype/phenotype correlation in these diseases could better define at risk patients improving cost/effectiveness of these tests.

017

GENETIC VARIANTS BETA-FIBRINOGEN GENE, ESPECIALLY G-455-A POLYMORPHISM, IN PATIENTS WITH THROMBOEMBOLIC DISEASE

S. Cammarieri¹, B. Lo Sasso¹, A. Caruso¹, C. Bellia¹, G. Bivona¹, R. Raineri¹, L. Liga¹, C. Migliorisi¹, L. Carubia¹, P. Maiorana¹, M. Ciaccio¹

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

Introduction. Increased plasma fibrinogen levels have been identified as a risk factor for myocardial infarction, stroke, and thrombosis. The polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene are associated with an increased plasma fibrinogen levels, particularly the distribution of the G-455-A polymorphism is associated with an increased in cardiovascular risk.

Materials and Methods. The aim our study was to determine the prevalence of single SNP in 75 patients affecting by cardiovascular diseases and without any other risk factors for atherosclerosis and in 75 control subjects. Total genomic DNA was extracted from whole human blood by genra procedure. DNA sample were amplified by a polymerase chain reaction (PCR) and the detection of the polymorphism G-455-A was investigated by the restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) using the enzyme HAEIII. The restriction fragments were separated by electrophoresis on 1,2 % agarose gel.

Results. For the beta-fibrinogen gene polymorphisms G-455-A the genotype frequencies of the patients affected by cardiovascular disease were 18.6% GG, 76% GA and 5.3% AA, while in control subjects they were 65.3% GG, 32% GA and 2.6 % AA.

Discussion. Our results indicate that significant differences were observed in the G-455-A genotype distributions between patients with cardiovascular disease and controls groups. In conclusion, the data indicate that higher frequency of the G/A, beta-fibrinogen gene polymorphisms G-455-A, in patients than controls groups, represent important risk factor for cardiovascular disease.

Reference

1. Martiskainen M, Erkinjuntti T, et al. Stroke 2003;34:886-91.

018

MUTATION IN BETA-FIBRINOGEN GENE (C148T) IS IMPORTANT RISK FACTOR IN PATIENTS AFFECTED BY THROMBOEMBOLIC DISEASE

S. Cammarieri¹, B. Lo Sasso¹, A. Caruso¹, C. Bellia¹, G. Bivona¹, R. Raineri¹, R. Carollo¹, L. Liga¹, M. Ciaccio¹

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

Introduction. Increased plasma fibrinogen levels have been identified as a risk factor for myocardial infarction, stroke, and thrombosis. The polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene are associated with an increased plasma fibrinogen levels, particularly the distribution of the C-148-T polymorphism is associated with an increased in cardiovascular risk.

Materials and Methods. The aim of our study was to determine the prevalence of single SNP in 75 patients affecting by cardiovascular diseases and without any other risk factors for atherosclerosis and in 75 control subjects. Total genomic DNA was extracted from whole human blood by genra procedure. DNA sample were amplified by a polymerase chain reaction (PCR) and the detection of the polymorphism C-148-T was investigated by the restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) using the enzyme HINDIII. The restriction fragments were separated by electrophoresis on 1,5% agarose gel.

Results. For the beta-fibrinogen gene polymorphisms C-148-T the genotype frequencies of the patients affected by cardiovascular disease were 33.3% CC, 65% CT and 1.6% TT, while in control subjects they were 70% CC, 25% CT and 5% TT.

Discussion. Our results indicate that significant differences were observed in the C-148-T genotype distributions between patients with cardiovascular disease and controls groups. In conclusion, the data indicate that higher frequency of the C/T, beta-fibrinogen gene polymorphisms C-148-T, in patients than controls groups, represent important risk factor for cardiovascular disease.

Reference

1. Martiskainen M, Erkinjuntti T, et al. Stroke 2003;34:886-91.

019

GENETIC POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES GSTM1, GSTT1, GSTP1 AND GSTA1 AS RISK FACTORS FOR SCHIZOPHRENIA

P. Gravina¹, S. Masini¹, G. Spalletta³, A. Valentini¹, E. Paladini², C. Caltagirone³, G. Federici¹, S. Bernardini¹

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, PTV, Roma

²Dip. di Medicina Interna, Università di Tor Vergata, Roma

³Dip. di Neurologia Clinica, IRCSS Fondazione Santa Lucia, Roma

The oxidant damage, caused by the production of reactive oxygen species (ROS), is thought to have a role in schizophrenia predisposition. Glutathione S-transferases (GSTs) represent a family of enzymes involved in the cellular detoxification against ROS, so having a critical role in the protection against oxidative stress. The activity of some of these enzymes is influenced by the presence of genetic polymorphisms. In the present work, we determined GSTP1, GSTM1, GSTT1 and GSTA1 polymorphisms to investigate their role as susceptibility genes for schizophrenia.

We analysed 138 schizophrenic patients and 133 healthy controls, matched for age and sex in a case-control genetic association study. GSTM1 and GSTT1 genotypes were determined by conventional PCR, whereas GSTP1 and GSTA1 polymorphisms were studied by direct sequencing analysis.

We found that no one of these polymorphisms alone is significantly associated to schizophrenia. However, the combination of the absence of GSTM1 gene with the polymorphism GSTA1*B/*B, leading to lower levels of GSTA1 enzyme, and the presence of GSTT1 gene, represents a risk factor to schizophrenia development. Our results indicate that polymorphisms affecting the activity of only one GST enzyme are not associated to schizophrenia, probably because they often act together and are able to substitute one to each other. However the combination of different GST polymorphisms has a role in schizophrenia predisposition, probably affecting the capacity of the cell to detoxify the oxidized metabolites of catecholamines.

020

GSTP1 B ALLELE INCREASES THE RISK FOR ASTHMA IN CHILDREN

P. Gravina¹, F. Angelini³, M. Chianca³, A. Valentini¹, S. Masini¹, R. Iannini³, A. Pierantozzi², V. Moschese³, G. Federici¹, L. Chini³, S. Bernardini¹

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, PTV, Roma

²Dip. di Medicina Interna, Università di Tor Vergata, Roma

³Dip. di Pediatria, Università di Tor Vergata, Roma

Background. Asthma is a chronic disease in which has been described, as part of the bronchial inflammation, an increase of oxidative stress. Glutathione-S-transferases (GST) are an attractive target for asthma because they are critical in the protection of cells from reactive oxygen species (ROS).

In the present study we analyzed the contribution of GSTM1, T1 and P1 genes polymorphisms to the pathogenesis of different subsets of paediatric asthma.

Methods. We compared the frequencies of GSTM1, GSTT1 null polymorphisms, detected by multiplex PCR, as well as GSTP1 Ile105/Val105 and Ala114/Val114 substitutions, analyzed by Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) analysis and Amplification Refractory Mutation System (ARMS) in the cases of ambiguity, in children affected by: IgE mediated asthma (n=64), non IgE mediated asthma (n=46), allergy without asthma (n=30), and in healthy age-matched children (n=57).

Results. We found a significant association of GSTP1 allele B (Val105, Ala 114) with non IgE mediated asthma (OR=2.097), but not with the other conditions. Moreover GSTP1 B/B and the combination of GSTP1 B with the deletion of GSTM1 further increased the risk (OR=12.4 and OR=3.1, respectively). On the other hand the combination of GSTP1 A allele with the presence of GSTM1 and GSTT1 genes represents a protective factor for asthma for both atopic (OR=0.45) and healthy children (OR=0.506).

Conclusions. The present report supports the hypothesis of an involvement of GST enzymes in paediatric asthma pathogenesis. A better understanding of the molecular mechanisms of antioxidants on ROS-mediated inflammatory response in asthma would provide information for the development of novel antioxidant therapies.

021

MELANOMA-ASSOCIATED MARKERS EXPRESSION IN BLOOD: MUC-18 IS ASSOCIATED WITH ADVANCED STAGES IN MELANOMA PATIENTS

M.C. Rapanotti¹, L. Bianchi², I. Riconzi², E. Campione², A. Pierantozzi¹, A. Orlandi³, S. Chimenti², G. Federici¹, S. Bernardini¹

¹Dep. of Internal Medicine and Dep. of Laboratory Medicine, PTV, Rome

²Dermatology Sec., Tor Vergata University of Rome

³Anatomic Pathology Sec., Tor Vergata University of Rome

⁴Bambino Gesù Children Hospital, IRCCS, Rome, Italy

Background. Multi-marker RT-PCR was firstly reported to reveal melanoma-associated mRNAs (MAMs) in melanoma cells but not in peripheral blood of healthy individuals. **Objectives.** To evaluate the expression of MAMs in peripheral blood of different AJCC stages melanoma patients, and to correlate their presence with early and/or advanced stages of the disease.

Patients/Methods. One hundred melanoma patients' blood samples (AJCC I-IV) were analysed using multi-marker RT-PCR to assess the co-expression of Tyr-OH, MART-1, MAGE-3, MUC-18/MCAM and p97. Patients were stratified into two disease-categories: early and advanced stages. The former includes in situ and I-II AJCC melanoma stages, the latter III-IV AJCC. χ^2 -square and Fisher's-exact tests were used to statistically evaluate the association between each MAM and disease-categories. The recognized significant associations were subsequently resubmitted to univariate logistic regression. Furthermore, sensitivity and specificity were established.

Results. At least one MAM could be detected in 24% of our series. Tyr-OH was the most common marker (14%), followed by MUC-18(12%), MART-1(5%), MAGE-3(4%) and p97(3%). No significant association among Tyr-OH, MART-1, MAGE-3, p97 and disease stages were evidenced. Only MUC-18 was statistically associated ($p < 0.009$) with advanced stages alone or co-expressed with other MAMs. According to logistic regression univariate analysis, MUC-18 increases the probability (Odds Ratio:33) to be in advanced stages and the incidence of recurrences [C.I.95% 2,9-374].

Conclusions. MUC-18 RT-PCR assay could be proposed as adjunctive molecular parameter in the management of melanoma patients useful in the monitoring of study protocols.

022

THROMBIN ACTIVATABLE FIBRINOLYSIS INHIBITOR (TAFI) POLYMORPHISMS AND RECURRENT PREGNANCY LOSS

S. Masini¹, C. Ticconi², P. Gravina¹, M. Tomassini², A. Pietropolli², V. Forte¹, M. Oliva¹, G. Federici¹, E. Piccione², S. Bernardini¹

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, PTV, Roma, Italy

²Dip. di Chirurgia, Sez. di Ginecologia ed Ostetricia, Università di Tor Vergata, Roma, Italy

Objective. To investigate the possible association between selected Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) single nucleotide polymorphisms (SNPs) and recurrent pregnancy loss (RPL), we analyzed 86 women with two or more miscarriages and 72 women with at least two successful pregnancies.

Method. TAFI SNPs -438A/G, +505A/G, +1040T/C, +1542C/G and +1583A/T were determined by PCR reactions and sequencing analysis performed on genomic DNA obtained by peripheral blood samples.

Main outcome measures. Analysis of the genotype and allele frequencies of TAFI SNPs in women with and without RPL were compared by the χ^2 test.

Results. Genotype and allele frequencies of TAFI +505 and +1583 SNPs were significantly different in RPL women compared with control women. The frequencies of the +505 A/A and G/G genotypes were 1.2% and 61.6% in RPL women and 13.9% and 43.1% in control women, respectively. The frequencies of the +1583 A/A and T/T genotypes were 1.2% and 61.6% in RPL women and 13.9% and 45.8% in control women, respectively. The genotype and allele frequencies at TAFI position -438, +1040 and +1542 were not significantly different between RPL and control women.

Conclusion(s). SNPs leading to increased TAFI levels are associated with a reduced risk of RPL. It is possible that TAFI is involved in RPL.

023

DESCRIPTION OF A "NOVEL" G6PD MUTATION FOUND IN A FAMILY OF SOUTHERN ITALY

A. Minucci¹, P. Concolino¹, Z. Cecilia¹, B. Giardina¹, E. Capoluongo¹

¹Laboratory of Clinical Molecular Biology, Catholic University of Rome, Italy

Background. In Italy, in regions such as Lazio, Campania, Calabria, G6PD deficiency appears to be more widespread than before and both because tests to identify are more sensitive and specific and both because it is very probably in recent years there has been a migration of people from the islands to the mainland.

Methods. The present study reports a case of moderate G6PD deficiency discovered in a 8-month-old male newborn with prolonged neonatal jaundice at birth, born in the Italian Campania Region.

G6PD activity, performed on the baby and on the mother, was determined following the WHO recommendations. On the mother was been made also the enzymatic test using G6PD/6PGD ratio.

Therefore, we performed a preliminary genetic screening including only the most frequent Italian G6PD mutations. Since this test was negative, we decided to sequence the entire G6PD gene.

Results. The G6PD activity of the baby is resulted to be 118 IU/GR (normal value: 220-570), and 4,7 IU/g Hb (normal value: 7-20). G6PD activity of the mother is resulted to be in the normal range using the classical G6PD biochemical test, and pathological (0.6; normal value: > 0.85) using the G6PD/6PGD test.

The direct sequencing analysis of exons, showed the presence of missense mutation of T > G at nucleotide 383.

Discussion. With regard to class II and III G6PD-mutations, it is difficult to identify the enzyme deficiency, especially when the transmission of the disease in the female line occurs. In these cases, if the subject resides in an area where the G6PD deficiency is more frequent can be useful to perform the biochemical assay test for reveal G6PD deficiency and to include it in a normal control panel or to perform biochemical test more sensitive in identifying heterozygous women, such as the test using the G6PD/6PGD ratio.

This family study has led to the discovery of a mutation of G6PD which can be regarded as novel because, despite it was reported in 2001 by Martinez et al, only in this study phenotypic expression is reported. Analysing the enzymatic activity level observed in the baby, this mutation can be considered of Class III mutation.

Conclusions. Introducing the G6PD assay in a normal control panel and using more specific test to identify the heterozygous asymptomatic women, becomes easier to underline a possible child affected and thus to G6PD deficiency triggered by external agents and to control the neonatal jaundice.

024

G6PD HETEROZYGOTE FEMALES INDIVIDUATION: GOAL OF THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE LABORATORY ASSAY

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

¹Laboratory of Clinical Molecular Biology, Catholic University of Rome, Italy

Background. G6PD deficiency is the most common defect of red blood cells. Some different laboratoristic procedures are used for the heterozygote females (HF) individuation. HF should be early warned and, when necessary, treated as if they are completely G6PD deficient. The recognition of HF is very difficult because the epidemiological prevalences should be lower than those expected. None of the screening tests can reliably identify HF: thus early individuation of female carriers of a defective G6PD variant, represent a very important diagnostic challenge.

Methods. A sample of 100 females screened with the classical G6PD biochemical quantitative test and the enzymatic approach measuring the G6PD and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activity separately and then utilizes the ratio of the two enzymatic activities.

Results. The G6PD/6PDG ratio resulted more sensitive as compared with the classical test, allowing to address to the genetic analysis also other 17 females resulted negative at the classical quantitative analysis. Finally, the genetic analysis of 38 G6PD/6PDG ratio-positive females confirmed the presence of mutations. Thus, we suggest to perform only the ratio test on females, to improve the detection rate of possible mutation carriers. We highlight that it is very important the correct choice of the cut-off: we think that a value of < 0.85 should permit the correct identification of HF.

Discussion. The X-inactivation phenomenon deserves important consideration. The females, can be either normal or deficient (homozygous), or intermediate (heterozygous). HF with extremely skewed X inactivation have activity ranging from hemizygote to normal. In fact, the presence of a genetic mosaics in females, represents the most important clinical implication. In fact, HF may show a hemizygote-like phenotype as compared with other autosomal recessive enzyme deficiencies, where heterozygote are asymptomatic because cells, with an enzyme level close to 50% of normal, are unaffected. Therefore, G6PD deficiency may be expressed both biochemically and clinically in heterozygote, with different degrees of severity. The use of a more sensitive enzymatic approach can improve the individuation of HF; in fact, using the G6PD/6PDG ratio it is possible to have an absolute measure of G6PD deficiency, which is not affected by the hemoglobin individual variations, red blood cells, reticulocytes and leukocytes amounts.

025

ALTERNATIVE SLICING VARIANTS OF CARBONIC ANHYDRASE IX (CA IX) IN NON SMALL CELL LUNG CARCINOMA

F. Malentacchi¹, C. Nannelli¹, L. Simi¹, A. Janni², S. Pastorekova³, C. Orlando¹

¹Dept. Of Clinical Physiopathology, U.O. Clinical Biochemistry, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence, Italy

²Unit of Thoracic Surgery, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence, Italy

³Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

Background. Hypoxia is associated with malignant progression and poor outcome in human cancers. Recent studies indicated that carbonic anhydrase IX (CA IX) is an intrinsic marker of hypoxia, induced by HIF activation. CA IX is a prognostic marker in some human cancers.

Aim. Recently it was demonstrated that CA IX expression involves an alternative splicing that generates two variants: AS isoforms, lacking exons 8-9 and coding for a truncated protein and the full-length (FL) isoform, containing the entire coding sequence. AS is strongly expressed in normal, normoxic tissues and can interfere with FL measurement, mainly induced by hypoxia.

Methods. The study group included 98 non small cell lung carcinoma (NSCLC) (age: 46-81ys) with 38 month median follow-up (range: 2-56 month) and paired apparently normal tissues. We measured with real-time PCR the mRNA expression of FL and AS CA IX, to exactly quantify their reciprocal expression.

Results. FL and AS mRNAs were simultaneously detectable in NSCLC and paired not affected tissues, but only FL was significantly overexpressed in NSCLC ($p = 0,01$). The AS variant was the prevalent form in normal tissues ($66 \pm 3\%$), whereas in NSCLC the same isoform was significantly reduced ($p = 0,001$) and FL was the most expressed variant ($58 \pm 2\%$). In node positive patients, FL mRNA was significantly higher ($p = 0,009$) than node negative ones, whereas AS mRNA level were unchanged. Patients in advanced stage had a significant higher expression of FL mRNA ($p = 0,04$), but not for AS variant. Kaplan-Meier analysis revealed that elevated expression of FL mRNA was significantly related to a reduced Disease-Free-Survival (DFS) ($p < 0,0001$) and worse overall survival (OS) ($p < 0,0001$). On the contrary the expression of AS mRNA was not related to DFS and showed only a minor correlation with patient OS ($p = 0,011$). Multivariate analysis showed that only FL CA IX mRNA maintained its prognostic significance. The relative risk of cancer-related death was 6,1 fold increased in NSCLC with high FL expression in comparison to low expression cancers, whereas AS expression did not maintain any clinical value in multivariate analysis.

Conclusions. Our data seem to indicate that FL CA IX expression is a valuable marker in NSCLC.

026

HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS FOR RAPID DETECTION OF KRAS, BRAF AND PIK3CA ONCOGENE MUTATIONS IN COLORECTAL CANCER

N. Pratesi¹, L. Simi¹, S. Vinci¹, M. Vignoli², R. Sestini², E. Mini³, M. Pazzagli¹, O. Claudio¹

¹Clinical Biochemistry, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Florence, Italy

²Medical Genetics, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Florence, Italy

³Department of Preclinical and Clinical Pharmacology, University of Florence, Florence, Italy

High resolution melting analysis (HRMA) provides a valid approach to efficiently detect DNA genetic and somatic mutations since the resulting melting profile gives a specific sequence-related pattern allowing discrimination between wild-type sequences and homozygote-heterozygote variants (1). Mutation scanning with HRMA is based on the dissociation behaviour of DNA when exposed to an increasing temperature. Signal modification is generated from the transition of a double DNA to single strand in the presence of fluorescent dyes actively intercalating double-stranded DNA; by monitoring the decrease of fluorescent signal, a sequence specific profile is generated. In recent years, the research and clinical management of CRC have changed and been revised on the basis of genetic features that characterize this tumor and it is then reasonable to insist in the development of achievable genetic tests to facilitate patient stratification for targeted therapeutic approaches. Therefore, rapid detection of multiple mutations with high accuracy in a series of known oncogenes will be more often requested in the future clinical management.

With this purpose we screened 116 colorectal cancers (CRCs) to detect hot spot mutations in KRAS and BRAF oncogenes. Mutational hot spots on PIK3CA gene, exon 9 and 20, were also investigated. Direct sequencing was used to confirm HRMA results and characterize genotype. Abnormal melting profiles were revealed in 65 CRCs (56%), 16 of them harbouring mutations in two different genes simultaneously. The frequency of mutations was 17.2% for PIK3CA (11.2% in the exon 9 and 6% in the exon 20), 43.1% for KRAS exon 2 and 9.5% in the exon 15 of BRAF gene. We found a significant association between PIK3CA and KRAS mutations ($p = 0.008$) while KRAS and BRAF mutations were mutually exclusive ($p = 0.001$). This work describes a novel approach in the detection of PIK3CA somatic mutations by HRMA and confirm the reliability of this methods in somatic mutation detection in terms of sensitivities and rapidity.

Reference

1. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007;8:597-608.

027

QUANTIFICAZIONE DELLA MUTAZIONE JAK2 V617F TRAMITE REAL TIME PCR (RT - PCR) IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE

C. Parma¹, F. Sciarini¹, A. Cappellani¹, F.M. Biella¹, M. Piatti¹, S. Signorini¹, P. Mocarelli¹, P. Brambilla¹

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

Introduzione. Le Malattie Mieloproliferative Croniche (MMPC) sono caratterizzate dall'espansione clonale della linea mieloide e comprendono la Policitemia Vera, la Trombocitemia Essenziale e la Mielofibrosi Idiopatica. La recente descrizione di una mutazione puntiforme nel gene JAK2 (Janus Kinase 2), che causa la sostituzione di una Valina conservata in posizione 617 con una Fenilalanina (V617F), presente nella maggioranza dei pazienti affetti da MMPC, offre un target molecolare utile per la diagnosi. Poiché la percentuale di cellule mutate presenti nei pazienti può essere esigua è importante l'utilizzo di metodi altamente sensibili per la ricerca della mutazione. La letteratura si è focalizzata sulla RT-PCR, più sensibile, rapida ed efficiente delle tecniche descritte in precedenza.

Scopo. Quantificazione della percentuale di alleli JAK2 con la mutazione V617F tramite RT-PCR.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 49 pazienti con diagnosi di sospetta MMPC in cura presso le Divisioni di Medicina del nostro ospedale. La mutazione JAK2 V617F è stata ricercata tramite sequenziamento automatico e RT-PCR semiquantitativa (ABI PRISM 310 e kit Experteam; ABI PRISM 7900 HT, Applied Biosystems).

Risultati. All'analisi mediante sequenziamento 10 pazienti presentano unicamente l'allele mutato, 11 entrambi gli alleli, mentre 28 solo l'allele normale. L'analisi in RT-PCR evidenzia 5 pazienti con una percentuale superiore al 75% per l'allele mutato, 5 con una percentuale superiore al 50%, 12 con una percentuale compresa tra 5 e 50% e 27 con una percentuale tra 0 e 5%.

Conclusioni. I risultati ottenuti con i due metodi analitici possono essere definiti concordanti. Nella metà dei pazienti in cui il sequenziamento ha evidenziato solo l'allele mutato, la RT-PCR mostra una percentuale di mutazione maggiore del 50%; nell'altra metà questa risulta superiore al 75%. In 4 dei 28 pazienti che, mediante sequenziamento automatico, presentano solo l'allele normale, l'analisi tramite RT-PCR rivela invece una percentuale di alleli mutati compresa tra il 5 ed il 25% evidenziando una maggiore sensibilità della RT-PCR per la ricerca della mutazione.

Bibliografia

1. Wolstencroft E et al. *JMD* 2007;9:42-6.
2. Smith C, Guang F. *Human Pathology* 2007;39:795-810.

028

CHEMOTHERAPY-RELATED SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM ANALYSIS BY PYROSEQUENCING IN PHARMACOGENETIC

L. Simi¹, N. Pratesi¹, S. Vinci¹, C. Orlando¹, F. Di Costanzo², L. Antonuzzo², M. Pazzagli¹

¹Clinical Biochemistry, University of Florence, Italy

²Medical Oncology AOU Careggi, Florence, Italy

Pharmacogenetics is becoming an increasingly important field in the study of cancer chemotherapy treatment since specific genetic factors, such as SNPs, could alter drug metabolism and activity and then could predict drug toxicity and/or efficacy (1). For this approach Pyrosequencing analysis could represent a reliable strategy to rapidly define SNPs genotype in cancer-related therapy with high accuracy. Pyrosequencing is a method of DNA sequencing based on the "sequencing by synthesis" principle. The method allows sequencing of a single strand of DNA by synthesizing the complementary strand along and is based on the detection of DNA polymerase activity with a bioluminescent enzyme. Light is produced only when the nucleotide solution complements the first unpaired base of the template. The sequence of solutions which produce bioluminescent signals allows the determination of the sequence of the template. This innovative technique is particularly suitable for large pharmacogenetic studies in cancer. The main advantages of this technique is the high rapidity: conventionally 96 SNPs can be evaluated in less than 10 min, in comparison to competitive techniques. In addition, the instrumentation is an open system and kits are CE approved and now commercially available for the specific molecular targets.

Validated kit exist to perform analysis in specific molecular target involved in the following treatment response: fluoropyrimidine (DPYD IVS14+1G>A, TSER 28bp VN-TR, MTHFR C677T and A1298C), irinotecan (UGT1A1 TA repeat, CYP3A4 variant 1B, CYP3A5 variant 3, ABCB1 C3435T), platinum derivatives (GSTP1 A313G, XRCC1 G28152A, ERCC1 Thr241Meth and G135C) and taxanes (CYP3A4 variant 1B, CYP3A5 variant 3, ABCB1 C3435T and C1236T).

On this basis, we performed a preliminary study to detect SNPs involved in the response to specific chemotherapy treatment. Firstly, SNPs were analysed in a series of 40 control samples, to assess each allelic frequencies in our control population, and then we analyse 9 DNA samples obtained from whole blood of patients. In this limited set of patient samples the most frequent polymorphisms resulted in MTHFR gene: SNP C677T with 4/9 heterozygotes and A1298C with 3/9 heterozygotes.

Reference

1. Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 2005;107:155-76.

029

DETECTION AND COUNTING OF CIRCULATING TUMOUR CELLS (CTC) BY ISET (ISOLATION BY SIZE OF EPITHELIAL TUMOR CELLS) IN UVEAL MELANOMA PATIENTS AND COMPARISON WITH A RT-QPCR ASSAY FOR TYROSINASE

P. Pinzani¹, F. Salvianti¹, C. Mazzini², D. Massi³, U. Menchini², C. Orlando¹, M. Pazzagli¹

¹Dept. of Clinical Physiopathology, University of Florence, Italy

²Dept. of Oto-Neuro-Ophthalmology, University of Florence, Italy

³Dept. of Pathology, University of Florence, Italy

ISET (isolation by size of epithelial tumor cells) is a technique to directly isolate CTCs (circulating tumor cells) and CTMs (circulating tumor micro emboli) by filtration of peripheral blood through polycarbonate membranes with 8 µm pores [Am. J. Pathol. 156 (2000) 57–63]. Cells on the filter can be analyzed by immunological, cytological or biomolecular techniques (upon laser assisted microdissection). The method is very sensitive, being capable of detecting a single tumor cell added to 1 ml of blood.

Our aim was the counting and morphological characterization of CTCs isolated by ISET in blood of uveal melanoma patients. The results were compared to those obtained by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay for the evaluation of tyrosinase mRNA expression.

Peripheral blood (10 ml) from 17 patients was filtered by an ISET device (Metagenex, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. The resultant spots, each one corresponding to 1 ml of filtered blood, were stained with haematoxylin & eosin and counted.

8 patients showed the presence of CTCs. One of them had metastatic disease, all the others showed tumor growth by sonography, one had orbital invasion. Only one patient had a high number of CTCs on the filter with no clinical evidence of tumor growth. A statistically significant correlation (Fisher's exact test $p=0.029$) was found between RT-qPCR and ISET qualitative data: 4 patients were positive and 9 negative with both methods, while in 4 samples CTCs were detected only by ISET.

A statistically significant correlation was found between quantitative evaluation of the results obtained by the two methods (linear regression analysis of number of CTCs versus tyrosinase mRNA: $y = 0,2199x - 0,0613$; $R = 0,6$ $p=0,012$).

We demonstrated the feasibility of detection and counting of CTC by ISET in uveal melanoma patients. This is the first report that allows the comparison between a CTC direct method (ISET) and a CTC indirect method (RT-qPCR) performed in the same sample. The comparison between the results from the two technologies, despite of a significant correlation, show also some discrepancies. Further studies are required to improve the morphological and molecular characterization of CTCs in uveal melanoma.

030

DIRECT COUPLING OF FFE PROTEIN SEPARATION AND MALDI-TOF ANALYSIS

E. Michelucci¹, F. Francese¹, F.R. Dani¹, G. Pieraccini¹, G. Moneti¹, M. Nissum¹, C. Obermeier²

¹Centro Interdipartimentale di Spettrometria di Massa, Università di Firenze

²Becton Dickinson, Milano

BD™ Free Flow Electrophoresis (FFE) System for protein and cell organelle purifications provides a tool to reduce sample complexity and enriches low abundant proteins with high resolution and reproducibility. A preliminary study was carried out to verify the possibility of a direct coupling between FFE and MALDI-TOF.

A first set of buffers, optimized by BD for MALDI compatibility, was used to prepare solutions of four different biomolecular systems: peptides mixture (PepMix), Ribonuclease B, proteins mixture (ProtMix) and Cytochrome C. They have been tested at four different concentrations (20, 2, 0.2, 0.02 µM) and these solutions, as such or purified on ZipTip C18 cartridges, were analyzed through MALDI-TOF. The results were compared with those obtained for the same substances (in the same concentrations) dissolved in CH₃CN/TFA 0.1% 1/1, to evaluate the effect of buffers in MALDI analyses.

When dissolved in CH₃CN/TFA 0.1% 1:1, PepMix and ProtMix were detectable up to a 0.2 µM concentration while Rnase B and Cyt C were detectable up to a 2 µM concentration. In BD buffers, 2 µM was the limit concentration under which it was impossible to detect most of our standards. Therefore these buffers have demonstrated to be MALDI compatible, having only a weak effect in decreasing ionization efficiency.

The use of ZipTip C18 cartridges produced better results only in the case of Rnase B.

In a second experiment, a mixture of three peptides plus Cytochrome C and a mixture of four proteins were separated by FFE using a further set of buffers optimized for MALDI analyses.

The well plates coming from the two FFE separations were analysed by MALDI-TOF analysis. FFE/MALDI-TOF coupling demonstrated to be a quite good system for the separation and the analysis of proteins mixtures whereas the protocol for the peptides mix plus Cytochrome C still requires further optimization.

Finally, a real sample consisting of an homogenate of silk moth antennae was purified with the FFE System using the first set of buffers supplied by DB. Both satisfactory separation and good response in MALDI analyses were obtained.

031

SHORT-END INJECTION CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS METHOD FOR THE FAST EVALUATION OF DNA METHYLATION DEGREE

E. Pisanu¹, S. Sotgia¹, A. Zinellu¹, M. Sanna¹, B. Scanu¹, F. Serralutzu¹, M.E. Sini¹, S. Pinna¹, A. Marchisio¹, L. Deiana¹, C. Carru¹

¹Department of Biomedical Sciences, Chair of Clinical Biochemistry, University of Sassari

DNA methylation is the most studied epigenetic post-synthesis modification of DNA polymer. In this reaction, which involves principally bulk DNA at the palindromic dinucleotide 5'-CpG-3' level, a hydrogen atom is replaced with a methyl group in the carbon 5 position of the pyrimidine ring of cytosine (C) to form 5-methylcytosine (mC). A specific class of DNA methyltransferases catalyzed this transformation by using S-adenosyl-L-methionine as methyl group donor. When this process is framed in a pathological context, the dysregulation in the expression of the genes involved can directly lead to many different disease states. Hence, for the impact that an aberrant either hypo- or hyper-methylation of cytosine may have on human health, techniques to reliably detect and measure DNA methylation are important tools for diagnostic and biological investigations. In this light, we propose a new method applying short-end injection technique for the fast evaluation of total genomic DNA methylation degree, expressed as methylcytosine/total cytosine ratio. Moreover, in order to find links between DNA methylation and some potential epigenetic biohumoral mediators, we have also measured the plasma levels of some biochemical parameters such as homocysteine, cysteine, methionine, glycaemia, total cholesterol, HDL cholesterol, creatinine and triglycerides as well as the correlation between age and DNA methylation status in 71 apparently healthy individuals (28 males, 43 females) aged from 13 to 86.

By short-end injection and by using a 100 mmol/l Tris solution titrated with 1 mol/l phosphoric acid to pH 3.75 as background electrolyte, cytosine and methylcytosine were separated with a good resolution ($R_s=3.4$) in 1.1 (%RSD=0.12%) and 1.2 (%RSD=0.18%) minutes, respectively, with a good efficiency ($C=25.000$ N/m, $mC=19.000$ N/m). The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) evaluated by a signal-to-noise ratio equal to 3 and to 10, respectively, were 0.04 and 0.15 $\mu\text{mol/l}$, respectively. Stepwise multiple linear regression with DNA methylation degree as the dependent variable and age, cysteine, homocysteine and methionine as independent variables, showed a negative association with age and that total cysteine is the most important determinant of DNA methylation.

032

ESPRESSIONE DELLA PROTEINA ZAP-70 E STATO MUTAZIONALE DEL GENE IGVH: UTILI SOLO NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA?

F. Sciarini¹, C. Parma¹, F.M. Biella¹, A. Cappellani¹, A. Soccodato², M. Piatti¹, S. Signorini¹, P. Brambilla¹, P. Mocarelli¹

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

²Divisione di Ematologia, Osp. S. Gerardo dei Tintori di Monza (MI)

Introduzione. I disordini linfoproliferativi cronici comprendono un gruppo eterogeneo di neoplasie maligne di derivazione linfocitaria.

L'espressione della proteina ZAP-70 e lo stato mutazionale del gene IgVH si sono dimostrati due fattori prognostici indipendenti nei pazienti affetti da leucemia linfatica cronica (LLC). ZAP-70 positivo e IgVH non mutato sono associati a un decorso clinico sfavorevole nella LLC. Pochi dati sono ad oggi disponibili riguardo la valutazione di queste variabili nei processi linfoproliferativi cronici di natura B cellulare diversi da LLC. Scopo del nostro lavoro è studiare l'espressione di ZAP-70 e lo stato mutazionale di IgVH in tali pazienti.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 27 pazienti affetti da processi linfoproliferativi cronici a cellule B diversi da LLC in cura presso le Divisioni di Medicina dei nostri ospedali. La casistica è composta da 10 pazienti con linfoma mantellare, 9 definiti come linfomi non Hodgkin, 3 con leucemia a cellule capellute, 2 linfomi follicolari e 1 leucemia prolinfocitica.

Lo stato mutazionale del gene IgVH è stato esaminato tramite sequenziamento automatico (ABI PRISM 310, Applied Biosystems) e considerato non mutato se l'omologia calcolata è superiore al 98% (V-BASE).

L'espressione di ZAP-70 in almeno il 20% dei linfociti B è considerata positiva ed è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica (Backman-Coulter Epics XL.MCL)

Risultati. L'analisi dell'espressione di ZAP-70 è stata eseguita per 25 pazienti ed è risultata positiva in 13 casi (52%) mentre i restanti 12 sono negativi (48%).

Per 23 pazienti è stato possibile effettuare l'analisi dello stato mutazionale del gene IgVH, il 68% (17/23) presenta il gene IgVH mutato (VH-M) mentre il rimanente 24% (6/23) non mutato (VH-NM).

Le famiglie del gene IgVH rappresentate sono: VH3 (57%), VH4 (22%), VH1 (13%), VH2 e VH5 (entrambe 4%).

Conclusioni. I risultati sono concordi con la letteratura in merito alle variabili studiate.

Lo studio proseguirà con la raccolta dei dati clinici indispensabili per la valutazione di un eventuale valore prognostico di questi marcatori.

Bibliografia

- Tracey L et al. Haematologica 2008;93(8):1186-94
- Admirand JH et al. Mod Pathol 2004;17:954-61

033

LA VITILIGINE: DEREGOLAZIONE SU BASE GENETICA DEI MECCANISMI DI PRODUZIONE DEI TIOLI

M.F. Mazzeo¹, B. D'Andrea², M. Paduano³, G. Varriale⁴, L. Postiglione³

¹Istituto di Scienza dell'Alimentazione, CNR, Avellino

²DiaChem s.r.l. Tecnologie Biomediche e Biologia Molecolare, Napoli

³Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

⁴Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

La vitiligine è una dermatosi diffusa ad etiopatogenesi quasi completamente sconosciuta. Scopo della nostra ricerca è lo studio genetico e biochimico dei meccanismi etiopatogenetici della vitiligine su pazienti affetti da vitiligine e loro familiari.

Fasi sperimentali: 1) Analisi del livello di binding proteins (aptoglobina, ceruloplasmina), per valutare la capacità di legame vs molecole potenzialmente lesive della membrana cellulare, e di tioli liberi plasmatici come marcatori di stati di iperossidazione e mediatori di citotossicità. 2) Analisi molecolare degli enzimi di regolazione dei cicli di rimetilazione e transulfurazione. 3) Analisi dello status vitaminico: vit A e vit E in quanto parte del potenziale antiossidante e folati, vit B6 e B12 quali coenzima di attività enzimatiche regolatrici dello scambio dei metili.

Materiali e metodi. Pazienti: n.20 famiglie di cui sono in studio n.40 pazienti affetti da vitiligine e n.19 familiari non affetti.

Metodi. a) Analisi di aptoglobina e ceruloplasmina nel siero con metodi nefelometrici. b) Analisi di omocisteina e altri tioli nel sangue mediante cromatografia liquida HPLC in fase inversa e rivelazione in fluorescenza dei tioli liberi derivatizzati con fluorocromo c) Analisi di vit A ed E nel siero d) Identificazione, mediante analisi molecolare con PCR su DNA genomico e digestione con enzimi di restrizione, dei seguenti polimorfismi e mutazioni:

- Polimorfismo C677T e A1298C del gene codificante per l'enzima metilen-tetraidrolato reductasi (MTHFR)
- Polimorfismo A66G del gene codificante l'enzima metionina sintasi reductasi (MTRR)
- Mutazione 844ins68 e I278T del gene codificante l'enzima cistationina-beta sintasi (CBS)

Risultati. Nei pazienti esaminati abbiamo riscontrato, rispetto ai valori di controllo, diminuzione dei valori di aptoglobina, aumento dei valori di omocisteina plasmatici, normali livelli di vit.A e vit.E e aumento della prevalenza di polimorfismi in omo ed eterozigosi di MTHFR C677T, MTRR A66G e della mutazione CBS I278T.

Conclusioni. I dati ottenuti sono indicativi di una deregolazione su base genetica dei meccanismi di produzione dei tioli.

Bibliografia

De Franchis R, Fermo I, Mazzola G, et al. Contribution of the cystathionine beta-synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost* 2000;84(4):576-82.

034

GLUTATIONE-S-TRANSFERASI, UN MARKER PER IL RISCHIO DEL CA. PROSTATICO

G. Paduano¹, M. Cianciulli¹, V. Varriale², T. De Cristofaro³, E. Palermo¹

¹Lab Pat. Clin. A.O. San Giuseppe Moscati, Avellino

²D.B.B.M. Univ. Studi Federico II, Napoli

³I.E.O.S. CNR, Napoli

Il gene GSTP1, sul cromosoma 11q13, codifica per una proteina con funzione estremamente importante per il mantenimento delle funzionalità cellulari: la Glutatione-S-Transferasi (GST).

Essa appartiene ad una famiglia di enzimi per la biotrasformazione degli xenobiotici, in grado di detossificare sostanze ossidanti ed elettrofile mediante coniugazione con glutatione ridotto.

Nello sviluppo della neoplasia prostatica la struttura genomica delle cellule neoplastiche rimane spesso euploide, negli stadi più avanzati si accumulano alterazioni nella struttura dei cromosomi. La neoplasia sembra, essere conseguenza di una situazione di instabilità genomica dovuta ad una prolungata e ricorrente esposizione a fattori di danno al DNA (stress ossidativo) e/o di deficit nei sistemi di protezione cellulare. Lo studio è stato condotto su 171 uomini: 23 donatori sani (DS), 74 soggetti con IPB e 74(55 dei quali sono stati sottoposti ad intervento di prostatectomia radicale). Recidiva locale di malattia, precedentemente diagnosticata. L'età media era di 32.3 anni (range, 21-40 anni) per i DS, 62.9 anni (range, 38-80 anni) per gli uomini con IPB e 67.0 anni (range, 51-83 anni) per i pazienti con PC. Tutte le fasi sperimentali sono state realizzate utilizzando il kit Ampli GSTP1 prodotto dalla Dia-Chem Italia. Il kit si basa su una reazione di amplificazione di sequenze di DNA corrispondenti alla regione del promotore del gene GSTP1, il razionale della metodica si fonda su lavori scientifici inerenti il sequenziamento della regione regolatoria del gene GSTP1 ed i primers sono stati individuati nella regione delle GpG islands. Non si sono osservati casi di ipermetilazione del promotore del gene GSTP1 nei donatori sani (23/23), mentre il 40.5% dei campioni dei soggetti con IPB erano ipermetilati (30/74, 95% CI, 29.3-52.6%), arrivando al 79.7% nei pazienti con PC (59/74, 95% CI, 68.8-88.2%). Considerando i soggetti con IPB come gruppo di controllo, il test per la diagnosi del PC basato sulla valutazione dello stato di metilazione del GSTP1 è caratterizzato da una sensibilità del 79.7%, da una specificità del 59.5%, da un valore predittivo positivo (PPV) del 66.3% (95% CI, 60.0-71.6%), da un valore predittivo negativo (NPV) del 74.6% (95% CI, 65.0-82.6%) e da un odd ratio di 5.8.

Bibliografia

Nelson WG, De Marzo AM, et al. Preneoplastic prostate lesions, an opportunity for prostate cancer prevention. *Annals New York Academy of Sciences*; 135-144.

035

APPLICATION OF MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) FOR THE SCREENING OF SUBTELOMERIC REARRANGEMENTS IN CHILDREN WITH MODERATE TO SEVERE MENTAL RETARDATION

E. Danese¹, E. Meneghelli¹, F. Bernardi¹, F. Darra³, L. Zoccante³, G. Lippi², G.C. Guidi²

¹S.S.O Genetica Medica, Ospedale Policlinico GB Rossi, Verona, Italy

²Sez. di Chimica Clinica, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Italy

³Sez. di Neuropsichiatria Infantile, Dip. Materno Infantile e di Biologia-Genetica, Università degli Studi di Verona, Italy

Background. Subtelomeric rearrangements have been reported to occur in approximately 5% of patients with idiopathic mental retardation (IMR). These aberrations, may remain undetected by routine conventional cytogenetic analysis because of limited resolution in light microscopy. Increased detection of cryptic subtelomeric abnormalities may be achieved by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) which is the most widely used technique in cytogenetic laboratories. However, this assay is expensive and time consuming, because metaphase spreads are needed. Accordingly, FISH is only used on selected patient populations and is not indicated for broad screening. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is a new reliable, sensitive and inexpensive technique, which can be used as a high throughput prospective screening tool for subtelomeric rearrangements. Up to 46 different regions in the genome can be screened for deletions or duplications in a single reaction by MPLA, thus allowing a large number of samples to be processed simultaneously. The aim of this study is to introduce a novel strategy that combines the advantages of different technique for the screening of subtelomeric rearrangements.

Methods. We tested 50 children with moderate to severe IMR often associated with congenital malformations, growth retardation and/or dysmorphic features. DNA was extracted from EDTA-anticoagulated venous blood. MLPA was performed using SALSA P036D human telomere kit (MRC-Holland), a specifically set of probes designed for testing subtelomeric rearrangements. If an aberrant MLPA result was observed, FISH with a probe specific for the region of interest was performed to validate the result.

Results. Among 50 patients tested, 4 subtelomeric rearrangements were identified by MLPA: deletion 22q13, deletion 6p25.3, duplication 7q36.3 and deletion 21q22.3 (the last two rearrangements in a single patient as the result of unbalanced translocation of paternal origin). All these aberrations were confirmed by FISH.

Conclusions. Our preliminary data show a high degree of agreement between MLPA and FISH, suggesting that MLPA might be a rapid, accurate, reliable and cost-effective alternative to FISH for the screening of subtelomeric rearrangements in routine diagnostics.

036

SINDROME DI GILBERT E TATA BOX GENOTIPO: 10 ANNI DI ROUTINE E NUOVE PROSPETTIVE

R. Paciolla¹, O. Turri¹, L. Ferri², H. Nadry², E. Banfi¹, G. Melzi d'Eril¹, M.L. Biondi²

¹Dip Med, Chir e Odont, Università degli Studi di Milano

²Diagnostica Molecolare Infettivologica Azienda Ospedaliera San Paolo, Milano

La S. di Gilbert è caratterizzata da iperbilirubinemia indiretta e modesto ittero intermittente in assenza di altre malattie. La base molecolare consiste in una inserzione nel TATA-box del promotore di una TA repeats (sette: TA7, normali sei: TA6) del gene della UDP-glucuronosil transferasi (UGT-1A). Nel 1999 abbiamo introdotto il test per la S di Gilbert e eseguito 500 test genetici. Nella messa a punto abbiamo studiato 98 soggetti normali. La distribuzione genotipica era: 43 TA6/TA6 (43.9%), 39 TA6/TA7 (39.8%) e 16 TA7/TA7 (16.3%) con livelli di bilirubina (media+/-ds) statisticamente più elevati nei TA7/TA7 rispetto a quelli omozigoti per TA6 (1.47 +/- 0.92 mg/dl vs 0.45 +/- 0.17; p=0.001).

Metodo. DNA da sangue periferico (Quiagen) e sequenziamento diretto (Abi Prism 310). La Bilirubina è stata eseguita con analizzatore Modular (Roche). Dei 500 pazienti 200 erano donne e 300 uomini, età media 25.7 (range 1-80 anni). La distribuzione genotipica è risultata: 76 TA6/TA6 (15%), 154 TA6/TA7 (31%) e 270 TA7/TA7 (54%), statisticamente differente da quella dei controlli ($\chi^2=60.2$; p=0.00001) deponendo per una adeguatezza di richieste: più del 85% sono i portatori di almeno un TA7. Abbiamo considerato solo i livelli di Bilirubina inferiori a 2.0 mg/dl, in quanto è stato, arbitrariamente, deciso di porre questo come cut off di una possibile S. di Gilbert senza altra patologia. I dati hanno confermato i preliminari in quanto la Bilirubina dei TA7/TA7 (1.47 +/- 0.67 mg/dl) risultava statisticamente più alta sia di quella TA6/TA7 (0.79 +/- 0.39 p=0.04) sia di quella TA6/TA6 (0.68 +/- 0.29; p=0.0094). Spesso quando si ha a che fare con polimorfismi si pone l'interrogativo sul loro ruolo funzionale e sull'influenza nelle patologie ad essi correlate. La revisione della casistica ci porta a considerare questo polimorfismo realmente incisivo sul metabolismo della bilirubina. E' stato proposto lo studio di UGT-1A nella tossicità di farmaci antineoplastici (Irinotecan) e retrovirali (Atazanavir). Vista l'esperienza maturata in anni, il modesto costo, e i dati ottenuti nella S. di Gilbert è nostra intenzione applicare al più presto tale test alla farmacogenetica confidando nella solidità degli aspetti funzionali di questo polimorfismo.

037

NEUROTROPHINS AND RECEPTORS IN PLACENTAS FROM PREGNANCIES COMPLICATED BY HELLP SYNDROME AND INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION (IUGR)

M. Cecati¹, F. Orici¹, D. Sartini², P. Stortoni¹, S.R. Giannubilo¹, M. Emanuelli², A.L. Tranquilli¹

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

²Istituto di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Objective. To investigate the expression pattern and the role of neurotrophins and their receptors in the placentas from pregnancies complicated by HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets) syndrome and intrauterine growth restriction (IUGR). Neurotrophins are involved in growth, differentiation, survival, diseases, regeneration and normal functions of the neuronal system, but also play an important role in prenatal and post-natal brain development due to their neuro-protective action.

Study design. Placentas were collected from normal term pregnancies (n=10), pregnancies complicated by HELLP syndrome (n=10) and IUGR (n=10). Macroarray analyses were performed with GEArray Q Series Human Neurotrophin and Receptors Gene Array HS-018. The data were confirmed by quantitative Real-Time PCR. The Student's test was used for statistical analysis. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. The expression of 10 HELLP and 6 IUGR genes, respectively, was significantly different in the pathological groups compared to controls. In particular, 3 genes were up-regulated and 3 down-regulated in IUGR while 6 genes were up-regulated and 4 down-regulated in HELLP. Differential gene expression measurements (HELLP versus normal, and IUGR versus normal), performed by real-time PCR technique, revealed a significant down-regulation for STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) equal to 0.81-fold and 0.63-fold in HELLP and IUGR, respectively ($P < 0.05$).

Conclusions. Our data suggest that a variable capacity of producing some neurotrophins is a part of the pathogenic mechanism leading to IUGR and HELLP. In this context, the dysregulation of STAT3 is of special interest. This signalling factor is known to contribute to trophoblast invasiveness, and it has been hypothesized that STAT3 plays a central role in pathways that modulate placentation.

038

PANCREATIC CANCER GENE THERAPY WITH DIPHTHERIA TOXIN A (DTA) AND ITS VARIANTS CRM176 AND CRM197

E. Fadi¹, P. Fogar², F. Navaglia¹, D. Basso¹, E. Greco¹, C. Zambon², A. Stranges¹, A. Padoan¹, G. Pantano¹, M.C. Sanzari¹, S. Pedrazzoli², C. Montecucco³

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, Az. Osp., Padova

²Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Univ. Padova

³Dip. di Scienze Biomediche, Univ. Padova

Background. Bacterial toxins might be used for gene therapy. Pancreatic cancer (PC) lacks specific ligands and this hampers immunotoxin therapy. Our aim was to engineer gene expression vectors combining heat shock proteins (HSPs) promoter with the catalytic subunit A of diphtheria toxin (DTA) or its variants CRM176 and CRM197, to focus bacterial toxin action within PC cells.

Methods. Three heat-inducible EGFP expression vectors were engineered: V1 (91% homology to HSPA6); V2 (five heat shock elements upstream the minimal HSPA6 promoter); V3 (V1 and V2 combined). In DTAwt, DTA176 and DTA197 vectors, V3 promoter was used to control DTA, CRM176 and CRM197 expression. Treatment response was investigated in four PC cell lines.

Results. Optimal heat shock was established at 42.5 °C for 1.5 hours. V1 and V2 promoters induced similar eGFP protein translation (FACS analysis). The highest eGFP levels were recorded in V3 transfected PC cells ($F=112.3$, $p < 0.0001$ for BxPC3; $F=17.5$, $p < 0.001$ for MIAPaCa2; $F=20.6$, $p < 0.001$ for PANC1; $F=23.9$, $p < 0.01$ for PSN1). This finding was confirmed at the transcription level (V3 fold mRNA increase=30 vs 8 of V1 and V2). DTAwt or CRM176 transfected cell growth was significantly delayed at 37°C and completely arrested after heat shock. At 37°C the supposedly inactive toxin CRM197 caused mild distress and, after heat shock, it induced a 25 to 50% cell growth reduction.

Conclusions. We identified an efficient heat-inducible promoter which may be extremely useful to control the transcription of toxins whose lethal effects are dose related, such as CRM197. This is a promising starting point for PC gene therapy in vivo

Reference

Kageyama T, Ohishi M, Miyamoto S, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E. Diphtheria toxin mutant CRM197 possesses weak EF2-ADP-ribosyl activity that potentiates its anti-tumorigenic activity. *J Biochem* 2007;142(1):95-104.

039

RAPID IDENTIFICATION OF HLA DQ2 AND DQ8 BY A REAL TIME PCR-BASED METHODOLOGY

L. Briscini¹, I. Vallini¹, R. Albarosa¹, F. Pagani¹, A. Galiotta¹, M.A. Brognoli¹, G. Mantero¹

¹*Biodiversity spa, Brescia*

Celiac disease (CD) is an autoimmune disorder associated with a small bowel lesion induced by toxic gliadin components. Genetic susceptibility to celiac disease is strongly associated with HLA-DQA105-DQB102 (DQ2) and HLA-DQA103-DQB10302 (DQ8). Molecular HLA testing is considered a valid support in the confirmation/exclusion of CD, especially in high-risk groups, such as CD relatives, or when serological and histological data are ambiguous. The aim of our study was to develop a rapid real-time PCR assay, using sequence-specific primers and molecular probes for the typing of the DQ2 and DQ8 alleles, and thus provide an additive simple tool for the diagnosis of CD.

In our assay we simultaneously amplify the following alleles: DQA105, DQB102, DRB103; DQA102, DQB102, DRB107 (both encoding for the DQ2 molecule) and DQA103, DQB103, DRB104 (encoding for the DQ8 molecule). This test is rapid, sensitive, specific and reproducible for the identification of the haplotype susceptibility to CD. The study was performed on a cohort of 40 individuals previously HLA typed with commercial kits. The identification of the HLA alleles was performed with a unique PCR program by using eight PCR closed tubes with two fluorophores (for the HLA alleles and for the internal amplification control).

The assay yield strong and clear fluorescent signal without aspecific amplifications, PCR amplification and detection of the HLA alleles was accurate and unambiguous when performed from genomic DNA extracted from whole blood. All the samples showed the expected alleles in accordance with the previous typing (100 % of concordance).

The specificity of the assay is ensured by stringent reaction conditions and the selection of primers and probes, whose specificity was checked by sequences homology analysis. Repeated experimental assays, executed on a wide sample numbers, ensured the high specificity of the test.

Amplification was scored digitally, without further manipulation of amplified PCR products and with a higher accuracy than other methods.

This assay should increase accuracy and throughput, and reduce risks of contamination in the laboratories where testing for HLA DQ2 and DQ8 is performed for the diagnosis of celiac disease.

Reference

World J Gastroent 2006 Nov 7; 12(41): 6585-6593

040

BIOPEN HPV-DNA, DEVELOPEMENT OF A NEW REAL TIME PCR ASSAY FOR HPV TYPING AND COMPARISON WITH TWO MOLECULAR DIAGNOSTIC TESTS

M.A. Brognoli¹, I. Vallini¹, E. Rossi¹, A. Zanolini¹, F. Pagani¹, R. Albarosa¹, G. Mantero¹, L. Briscini¹

¹*Biodiversity S.p.a., Brescia*

HPV is a small DNA virus and induces lesions in cutis and mucosae known as warts. HPVs can be divided in cutaneous and mucosal ones standing to the lesion localization. Genital HPVs can be divided in high and low risk standing to their ability to induce cervical carcinoma (due to viral DNA integration).

Due to effective and regular Pap-test screening, high-grade lesions and mortality for cervical carcinoma have drastically reduced in developed countries. Pap-test has just one important limit, that is the impossibility to assess the presence of HPV in the sample.

Molecular biology offers useful and specific tests to confirm Pap-test diagnostic results and to identify the specific viral genotype.

HPV genotyping tests are based on DNA amplification/ibridization or viral genome sequencing.

Here we present a multiplex Real-Time PCR genotyping assay (BioGen HPV) based on fluorescent molecular probes and we show a comparison with the results obtained using DNA sequencing and INNO-LiPA HPV Genotyping (INNOGENETICS).

BioGen HPV allows detection and typing of 12 high risk HPV (16-18-31-33-35-45-52-53-56-58-66-73) and 3 low-risk (6-11-61) and identifies possible coinfections.

This test is extremely user-friendly (it is composed by four mix and each one identifies three HPV genotypes) and allows to speed up the analytic procedure: in two hours an HPV sample is genotyped.

The test uses specific primers mapping in the overlapping region between E1 and E2, the genes involved in the integration process. Every different HPV is identified by a genotype-specific probe. The test uses four different fluorophores.

The validation of this assay was conducted by comparison with DNA sequencing (200 samples) and INNO-LiPA HPV Genotyping assays (60 samples).

In the first case (BioGen HPV-HR vs sequencing) the global concordance was of 91%. In the second case (BioGen HPV-HR vs INNO-LiPA HPV Genotyping) the global concordance was of 100%.

Coinfections were identified in the 26,8% of cases, in line with scientific literature reports.

The analytic protocol could be implemented for the detection of other genital HPV, according to future discoveries in the field of genital HPV, and analytic procedure could be made faster through the use of a microarray platform.

Reference

N Engl J Med 2003;348:518-27.

041

ADIPONECTIN RECEPTOR, AdipoR1, IS REDUCED IN FAILING HEART: STUDY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PACING INDUCED HEART FAILUREC. Caselli², M. Cabiati², T. Prescimone¹, S. Del Ry¹, V. Lionetti², M. Emdin¹, F. Recchia², D. Giannessi¹¹CNR Institute of Clinical Physiology, Fondazione G. Monasterio, Pisa, Italy²Scuola Superiore S. Anna, Pisa, Italy

Purpose. Adiponectin, beside its effects on glucose metabolism, plays important protective functions against cardiovascular disease. While the connection between adiponectin and increased cardiovascular risk appears well defined in patients with coronary artery disease and myocardial infarction, its role in heart failure (HF) seems more complex and the hypothesis of a functional resistance to adiponectin has been suggested. In order to assess its autocrine/paracrine role in the heart, mRNA expression of adiponectin and its receptors, AdipoR1 and AdipoR2, was evaluated in cardiac tissue obtained by an experimental animal model of pacing-induced HF.

Methods. Left ventricular tissue was collected from male adult minipigs without (control, n=8) and with pacing-induced HF (n=5). HF was induced by rapid pacing (180 beats/min) for 3 weeks. mRNA expression of adiponectin and its receptors was determined by semi-quantitative RT-PCR in each sample.

Results. In failing hearts adiponectin expression was increased with respect to control (1.48 ± 0.25 vs 1.16 ± 0.27 in controls, normalized on GAPDH). AdipoR1, whose expression was in all cases higher than that of AdipoR2, was significantly reduced in HF (0.96 ± 0.046 vs 1.27 ± 0.06 , $p=0.0018$ HF vs controls).

Conclusions. This preliminary study confirms the adiponectin relevance in HF as pathophysiological mediator. The significant reduction of AdipoR1 in HF agrees with the hypothesis of an adiponectin resistance in this condition.

ReferenceKintscher U. Does adiponectin resistance exist in a chronic heart failure? *Eur Heart J* 2007;28:1676-77.

042

APOPTOSIS MARKERS IN THE HEART OF MINIPIGS WITH LEFT VENTRICULAR PACING-INDUCED HEART FAILURET. Prescimone¹, C. Caselli², M. Cabiati², C. Colotti², S. Del Ry¹, V. Lionetti², M. Emdin¹, F. Recchia², D. Giannessi¹¹CNR Institute of Clinical Physiology, Fondazione G. Monasterio, Pisa, Italy²Scuola Superiore S. Anna, Pisa, Italy

Purpose. Etiology of heart failure (HF) involves multiple agents and conditions and the progressive loss of cardiac myocytes is one of the most important pathogenic components. Aim of this study was to evaluate, in an experimental model of pacing-induced HF, the variations of apoptotic process which has pivotal role in the pathophysiology of HF, by measuring the mRNA expression of Caspase (Casp)-3 and Casp-9, the main executors of the apoptotic process and their relative regulation systems: Bcl-2 and Hsp72.

Methods. Five adult male minipigs (35-40 kg) were chronically instrumented with a unipolar pacemaker connected to the epicardial surface of the LV anterior wall (pacing site) to induce HF by rapid LV pacing (180 beats/min). As control, 5 healthy minipigs were studied. At 3 weeks, tissue samples of LV from pacing site were collected and mRNA expression of biomarkers was determined by semi-quantitative RT-PCR.

Results. After 21 days of pacing, EF% was 24.0 ± 3.7 (mean \pm sem) vs 70.8 ± 3.7 at baseline ($p < 0.001$). The mRNA expression of all apoptotic markers was significantly higher in failing regions than in controls (Casp-3: 1.50 ± 0.25 vs 0.35 ± 0.07 , $p=0.002$; Casp-9: 0.39 ± 0.082 vs 0.09 ± 0.05 , $p=0.016$). A parallel increase of the regulation systems was also observed (Bcl-2: 3.80 ± 0.74 vs 0.62 ± 0.12 , $p=0.003$; Hsp72: 0.52 ± 0.12 vs 0.072 ± 0.042 , $p=0.008$).

Conclusions. Our findings indicate that apoptotic mediators and their inhibitors are both upregulated in failing myocardium. This suggests the presence of a mechanism for modulating the apoptotic process and the possibility that cells with interrupted apoptosis might be able to recover their correct functionality contributing to reverse apoptotic process. This balance could represent a target for new therapies with potentially important implications about HF treatment.

ReferenceMasri C, Chandrashekhar Y. Apoptosis: a potentially reversible, meta-stable state of the heart. *Heart Fail Rev.* 2008 Jun;13(2):175-9.

043

IL CONTRIBUTO DEL DNA MICROARRAY ALLA PRATICA CLINICA

O. De Luca¹, A. Provenza¹, L. Aimati¹, M. Torre¹, G. Gentile¹, M. Simmaco¹

¹Dipartimento Scienze Biochimiche, UO Diagnostica Molecolare Avanzata (DiMA), Il Facoltà di Medicina, Università La Sapienza, Roma

Scopo. Determinazione delle variazioni individuali del DNA che influenzano la risposta ai farmaci in pazienti affetti da sindromi psicotiche.

Materiali e metodi. Si è estratto il DNA genomico da sangue intero a pazienti ricoverati presso il reparto di psichiatria dell'Ospedale Sant'Andrea di Roma, che è stato successivamente trattato secondo i protocolli Affymetrix per l'ibridazione sul AmpliChip CYP450 Test (Roche). Il chip consente la determinazione dei polimorfismi associati a due isoforme del citocromo P450: il citocromo P450 2D6 (CYP2D6), che codifica l'idrossilasi debrisoquina presenta 70 varianti alleliche [1] e il citocromo P450 2C19 (CYP2C19), che codifica l'enzima S-mefenitoina idrossilasi con due alleli delle varianti principali che danno come risultato una carenza enzimatica [2]. Queste due isoforme sono coinvolte nel metabolismo di numerosi farmaci tra cui anti-psicotici, anti-depressivi, anti-epilettici, beta bloccanti, inibitori delle pompe protoniche etc. L'analisi distingue 29 polimorfismi noti nel gene CYP2D6, inclusa la duplicazione e l'eliminazione del gene, e i due polimorfismi maggiori nel gene CYP2C19.

Risultati. Il Chip restituisce un risultato che evidenzia il tipo di metabolismo associato al soggetto esaminato, ad esempio "metabolismo ultrarapido", corrisponde a soggetti che presentano una o più duplicazioni del gene CYP2D6. Nella nostra esperienza di laboratorio questo fenotipo è stato recentemente individuato in un paziente psicotico con una annosa storia di tentati suicidi e di mancata risposta alla terapia.

Nel Giugno del 2006 a causa di un peggioramento della sintomatologia depressiva il paziente è stato trattato con farmaci contenenti clomipramina, escitalopram ossalato e aripripazole; le cure hanno riscosso scarso beneficio. E' da notare che questi farmaci sono metabolizzati nella catena del citocromo P450 dagli enzimi CYP 2D6 e 2C19. Il paziente è giunto alla nostra attenzione in seguito ad un tentativo di suicidio con assunzione impropria di farmaci. Conclusioni. L'analisi dei polimorfismi ha permesso di spiegare in parte il perché della mancata risposta ai farmaci da parte del paziente, guidando il medico curante nella somministrazione di una terapia più adeguata. Questa esperienza è l'esempio di come la farmacogenetica possa entrare nella pratica clinica quotidiana affiancando il medico nella scelta dei trattamenti ed evitando ai pazienti di sottoporsi a terapie inefficaci.

044

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DEGLI APLOTIPI HLA DQ2/DQ8 NELLA POPOLAZIONE DEL NORD SARDEGNA

E. Rimini¹, S. Vargiu², A. Azzena¹, A. Pinna¹, R. Serra¹, L. Rubattu¹

¹Lab. Analisi Chimico-Cliniche, Osp. SSma Annunziata, ASL N,1 Sassari

²Ist. Biochimica Clinica, Dip. Scienze Biomediche, Fac Medicina, Uni, Sassari

La malattia celiaca è una patologia multifattoriale, frequente (1:100 nati vivi), che sfugge spesso alla diagnosi e può dare complicanze talora irreversibili; è curabile e può essere diagnosticata con test di laboratorio semplici ed affidabili, fermo restando che il "gold standard" diagnostico è rappresentato dalla dimostrazione delle lesioni istologiche tipiche tramite biopsia intestinale.

La presenza dell'aplotipo HLA DQ2 o HLA DQ8 è una condizione necessaria per lo sviluppo della malattia celiaca, ma non sufficiente, in quanto non tutti i soggetti che presentano tale aplotipo, sviluppano necessariamente la malattia.

Scopo della ricerca, svoltasi nel quadriennio 2004/2008, era quello di analizzare con metodiche molecolari l'aplotipo HLA DQ2 o HLA DQ8 in circa 1500 soggetti afferenti al nostro Laboratorio, appartenenti a gruppi a rischio come familiari di 1° grado di pazienti celiaci, diabetici, Down, soggetti affetti da patologie associate alla celiachia e celiaci ma con aplotipo HLA non conosciuto.

Metodi. Amplificazione di DNA genomico con Multiplex PCR con kit commerciale Eurospital.

Risultati. I dati evidenziano che circa il 4% dei soggetti nei quali non è presente l'aplotipo HLA DQ2 o HLA DQ8, manifesta ugualmente la malattia.

Conclusioni. Si potrebbero ipotizzare mutazioni a livello del sito di legame dei primers utilizzati che impedirebbero l'amplificazione del gene bersaglio. Poiché l'espressione dell'aplotipo DQ è strettamente associato con il DR, effettueremo una ricerca più approfondita sia sui geni correlati DR3 DR5 DR7 che sui loci HLA DQA1 e HLA DQB1 con una nuova metodica ad alta risoluzione a livello allelico, per individuare eventuali aplotipi a rischio non DQ2/DQ8. Si ritiene utile comunque la ricerca di tali aplotipi HLA nella celiachia, soprattutto in pazienti con quadro anticorpale e biotipico dubbio o discordanti tra loro, in soggetti con carenza congenita di IgA, nei parenti di primo grado dei pazienti celiaci.

Bibliografia

Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, et al. HLA-DQ relative risks for coeliac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 2004;63:562-7.

045

VALUTAZIONE DEL KIT HEMOSIL THROMBOPATH PER LO SCREENING DELLA TROMBOFILIAG. Andreani¹, F. Veschi¹, M. Mosti¹, E. Mangia¹, R. Bruzzi¹, R. Antonucci¹, A. Del Genovese¹¹Lab. Analisi Biochimico-Cliniche e Microbiologiche ASL1, Massa-Carrara

La trombofilia è un disordine acquisito od ereditario associato ad una aumentata tendenza a sviluppare fenomeni tromboembolici. Il pannello dei test di screening impiegato nella maggior parte dei laboratori per lo studio della trombofilia comprende il dosaggio di proteina C (PC), proteina S (PS), antitrombina (AT), resistenza alla proteina C attivata (APCR), LAC, anticorpi antifosfolipidi, omocisteina, FVIII, e l'analisi della mutazione G20210A nel FII.

Scopo. Valutazione analitica del kit HemosIL Thrombopath (ThP) della ditta Instrumentation Laboratory come test di screening globale dei principali fattori protrombotici.

Il ThP indaga le possibili disfunzioni del sistema anticoagulante della PC misurando la generazione di trombina endogena ed esprimendola come % di inibizione della coagulazione indotta da Protac (PCI%). Risultati inferiori al cut-off potrebbero significare o la presenza di deficit di PC/PS o la presenza di APCR o di LAC. Abbiamo analizzato 98 pazienti pervenuti al nostro Laboratorio con il sospetto di rischio trombotico ai quali era stato eseguito in precedenza il dosaggio di PS, PC, AT, APCR, FVIII, omocisteina e LAC. Il valore di cut-off calcolato su 30 plasmi di individui sani era dell'80%.

Risultati. Dei 24 campioni con PCI<80%, 19 erano risultati patologici per uno o più dei seguenti parametri PS, PC, AT, APCR, FVIII, omocisteina, LAC; 4 che non presentavano nessuno di questi valori alterati, sono risultati positivi allo screening di mutazioni (2 omozigoti per C677T in MTHFR, uno eterozigote per G20210A nel FII, e uno eterozigote per H1299R nel FV); uno è risultato negativo sia allo screening coagulativo che a quello di mutazioni.

Per valori patologici di PS, PC, AT, APCR e LAC la sensibilità analitica di questo test è del 92%, la specificità è del 98%, il valore predittivo positivo del 96% e quello negativo del 97%.

Per livelli elevati di FVIII la sensibilità e la specificità del test si riducono notevolmente.

Infine sembra non esistere alcuna correlazione tra elevati livelli di omocisteina e ThP positivo.

Reference

Safa et al. Abstract from J Thromb Haemost 2005;3(1).

046

IL MONITORAGGIO DI LABORATORIO DELLE EPARINE A BASSO PESO MOLECOLAREL. Bassi¹, O. Paoletti¹, A. Alatri¹, A. Cogrossi¹, E. Spotti¹, N. Delpero¹, M. Stramezzi¹, S. Testa¹¹Azienda Istituti Ospitalieri, U.O. Lab. Anal. Chim. Clin. e Microbiol., Centro Emostasi e Trombosi, Cremona

Introduzione. Le eparine a basso peso molecolare (EB-PM) svolgono la loro azione anticoagulante soprattutto inibendo l'attività anti-Xa, senza apparente necessità di un monitoraggio di laboratorio. La somministrazione di eparina non frazionata è monitorata con l'allungamento dell'aPTT, quella delle EBPM in genere segue la relazione dose/peso.

Scopo. Scopo del lavoro è stato valutare:

1. la relazione tra eparinemia e attività anti-Xa
2. la corrispondenza tra range terapeutico e di profilassi
3. l'idoneità della calibrazione
4. la variabilità della risposta in relazione alla concentrazione di AT del campione

Materiali e metodi. Sono state testate le eparine del commercio: Nadroparina calcica (Seledie, Seleparina, Fraxiparina), Bemiparina sodica (Ivor), Enoxaparina sodica (Clexane), Dalteparina sodica (fragmin) e Parnaparin (Fluxum). E' stato utilizzato plasma normale(pool) con aggiunta delle diverse EBPM per ottenere concentrazioni di eparina tra 0.2UI/ml e 2UI/ml. Il dosaggio dell'attività anti-Xa è stato effettuato su coagulometro magnetomeccanico (STA-R Roche, Basel) utilizzando un metodo amidolitico commerciale (STA ROTACHROM HEPARIN) che richiede l'aggiunta di FXa. E' stata utilizzata la curva di calibrazione indicata.

Risultati. I valori di correlazione tra i risultati attesi e dosati per le diverse eparine sono compresi tra 0.9929 e 0.9990. E' stato quindi valutato l'effetto di diverse concentrazioni di AT sui livelli di attività anti-Xa. Infatti essendo l'eparina un anticoagulante indiretto essa agisce attraverso l'AT e pertanto i livelli di AT sono cruciali nel sistema. L'aggiunta in vitro di AT nel campione determina un aumento dell'azione dell'eparina.

Tab.1 relazione tra livelli di AT/attività anti-Xa

AT/III	Atteso	Trovato	Attività anti-Xa	1.0UI/ ml/0.5UI/ml
106%	106%	1.13	0.56	
53%	54%	0.82	0.42	
26.5%	26%	0.58	0.28	
13.2%	13%	0.36	0.14	

Conclusioni. Il metodo in uso risulta ben calibrato per le eparine testate e si evidenzia una corretta relazione tra eparine e attività anti-Xa. E' consigliabile che il dosaggio delle EBPM sia effettuato senza aggiunta di AT nel campione, per meglio descrivere ciò che effettivamente avviene in vivo e per non ottenere un livello di attività non corrispondente all'azione anticoagulante con il conseguente rischio di dosaggi non adeguati (ipotratamento).

047

VALORI DI RIFERIMENTO DELL'ANTIGENE DEL FATTORE DI VON WILLEBRAND NEI GRUPPI EMATICI 0 E NON-0

L. Bressan¹, S. Orsatti¹, G. Macchi¹, M.G. Biotti¹, G. Cattozzo¹

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche ed Ematologia, A.O. Osp. di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

Il fattore di von Willebrand (vWF) è una glicoproteina che media l'adesione e l'aggregazione delle piastrine alle proteine della matrice sottoendoteliale esposte a danno vascolare e stabilizza il Fattore VIII della coagulazione. Il deficit di vWF causa la malattia di von Willebrand; un accumulo di multimeri può predisporre alla formazione di trombi piastrinici. I test più significativi per la diagnosi di queste patologie sono la determinazione dell'antigene del fattore di von Willebrand (vWF:Ag) e la misura dell'attività del vWF sull'agglutinazione piastrinica in presenza di ristocetina. I valori di vWF:Ag sono influenzati dal gruppo ematico AB0: soggetti di gruppo 0 hanno valori inferiori rispetto a quelli di gruppo non-0 e quindi presentano un maggiore rischio di patologie emorragiche; di contro, individui degli altri gruppi ematici hanno un aumentato rischio di tromboembolismo venoso. I valori di vWF:Ag sono specifici per metodo analitico e reagenti impiegati. Scopo del presente studio è definire i valori di riferimento del vWF:Ag per i soggetti di gruppo 0 e non-0 utilizzando i reagenti vWF Ag* (Siemens Healthcare Diagnostics) sul coagulometro Sysmex CA-1500.

Abbiamo valutato 159 donatori periodici. I valori sono stati stratificati per sesso e gruppo ematico: maschi di gruppo 0 (0M; n = 43); femmine di gruppo 0 (0F; n = 44); maschi di gruppo non-0 (non-0M; n = 35); femmine di gruppo non-0 (non-0F; n = 37). Applicando le linee guida IFCC abbiamo calcolato gli intervalli di riferimento nei donatori di gruppo 0 e non-0.

I valori di vWF:Ag nel gruppo 0 (mediana = 77 %; centile 2,5 = 30%; centile 97,5 = 126%) sono più bassi rispetto a quelli di gruppo non-0 (mediana = 116%; centile 2,5 = 42%; centile 97,5 = 164%) in misura significativa ($p < 0,001$; test Wilcoxon). Inoltre i dati sono stati stratificati in base al sesso; questa partizione non ha dimostrato differenza significativa ($p > 0,05$): la mediana risultava pari a 76% per il gruppo 0M (centile 2,5 = 16%; centile 97,5 = 129%); 78% per il gruppo 0F (centile 2,5 = 31%; centile 97,5 = 116%); 116% per il gruppo non-0M (centile 2,5 = 7%; centile 97,5 = 157%) e 119% per il gruppo non-0F (centile 2,5 = 52%; centile 97,5 = 166%).

048

VALUTAZIONE DI METODICHE PER LA RICERCA DEL LUPUS ANTICOAGULANT

L. Caponi¹, M. Baldassarre², P. Pietrini¹, G. Devoto²

¹U.O. Laboratorio di Analisi Cliniche Specializzate Universitario, Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Diagnostica Molecolare, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana

²Laboratorio di Analisi, Asl 4 Chiavarese, Lavagna (GE)

Il termine Lupus Anticoagulants (LA) indica autoanticorpi diretti contro fosfolipidi (PL) o complessi PL-proteina. Tali anticorpi possono allungare i tempi di coagulazione dei test PL-dipendenti. Il test per la ricerca di LA è soggetto a numerose influenze da parte di variabili preanalitiche e dalla scelta dei test per lo screening che espongono il test a falsi positivi e falsi negativi (Tripodi A. Clin Chem. 2007;53:1629-35). Dal momento che in alcuni laboratori l'aPTT viene usato quale test di screening per la ricerca di LA, abbiamo effettuato una valutazione dei risultati delle richieste di ricerca di LA e di aPTT, con i relativi risultati pervenute dal gennaio al dicembre 2007 al Laboratorio Analisi di Lavagna dell'ASL 4 Chiavarese.

La ricerca del LA è stata eseguita sul coagulometro BCS della Dade-Behring con i reattivi LA1 di screening e LA2 di conferma secondo le istruzioni del produttore, che prevede lo screening con il reagente LA1 che esegue un test PL-dipendente; se il tempo di coagulazione risulta allungato si ripete il test con LA2 che contiene un eccesso di PL. Se LA2 non corregge l'allungamento si procede al mix test con plasma normale. L'aPTT è stato misurato sullo stesso apparecchio con il reattivo Pathromtin®.

Sono stati presi in esame 236 campioni che presentavano la contemporanea richiesta dei due test. Tra questi, 29 campioni avevano dimostrato presenza di LA. Di questi 29, solo 12 campioni presentavano un aPTT superiore alla norma. Il confronto tra gli aPTT e LA1 su tutti e 236 campioni dimostrava una mediana significativamente maggiore per LA1 (35,7 vs 30,0 sec, Wilcoxon test $p < 0,0001$), dimostrando sostanzialmente una maggiore sensibilità di LA1. Il bias (di circa 7 secondi) a favore dell'LA1 risultava anche dall'analisi di Bland Altman, che evidenziava uno scarto maggiore per tempi di coagulazione più elevati. La stessa analisi ristretta al sottogruppo di campioni LA positivi confermava l'evidenza di maggiore allungamento del tempo di coagulazione nel test LA1 con un bias più elevato (circa 15 sec).

Da questi risultati è possibile concludere che l'aPTT, almeno con il reattivo Pathromtin®, non è sufficientemente sensibile quale screening per LA, a differenza del test eseguito con il reattivo LA1.

049

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI EMOCOAGULATIVI IN PAZIENTI ONCOEMATOLOGICI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO

M. Martelloni¹, L. Macchia¹, C. Curreli¹, E. Panicucci¹, M.R. Metelli¹, P. Pietrini¹

¹U.O. Analisi Chimico Cliniche Specializzate Universitaria, A.O.U.P., Pisa, Italy

Scopo dello Studio. Lo studio si propone di valutare l'effetto che la chemioterapia ha sui parametri emocoagulativi in pazienti affetti da patologie oncoematologiche in attesa di trapianto di midollo osseo al fine di individuare potenziali marker predittivi di trombosi.

Materiali e Metodi. In 13 pazienti, ricoverati presso l'U.O. di Ematologia dell'AOUP, sono stati eseguiti il Tempo di Tromboplastina Parziale attivata (aPTT), il Tempo di Protrombina (PT), il fibrinogeno, il D-Dimero, l'Antitrombina, i fattori V, VII, VIII e von Willebrand, i Frammenti 1+2 della Protrombina (F1+2), il complesso Trombina-Antitrombina (TAT), l'attivatore tissutale del Plasminogeno (tPA) e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1). Gli esami sono stati effettuati in condizioni basali al momento del ricovero (tempo T0), al termine del regime di condizionamento farmacologico (tempo T1), ed a distanza di dieci giorni dal trapianto di midollo (tempo T2).

Risultati. I dati ottenuti hanno evidenziato tra il T1 ed il T2 un allungamento del tempo di PT ($P < 0,02$) correlato ad una riduzione significativa di fattore VII ($P < 0,01$). I valori di fibrinogeno si riducono al tempo T1 confermando l'aumentato livello allo stesso tempo dei valori di F1+2, indicando un'attivazione coagulativa. Al tempo T2 i valori di fibrinogeno invece incrementano; a tale incremento si associa una diminuzione di F1+2. Le variazioni a carico del fattore VIII, del fattore di von Willebrand e del fattore V, tra il tempo T0 ed il T1 ($P < 0,01$) e tra il T0 ed il T2 ($P < 0,01$) risultano statisticamente significative;

Conclusioni. I risultati da noi ottenuti, ed in particolare l'accorciamento dell'aPTT, direttamente correlato all'aumento del fattore VIII, avvalorano quanto riportato in letteratura riguardo al ruolo fondamentale svolto dall'endotelio nella patogenesi della trombosi. Il riscontro incremento dei fattori plasmatici sopracitati sta a conferma dell'avvenuto danno endoteliale.

Riferimenti

Prandoni P et al. Recurrent thromboembolism in cancer patients: incidence and risk factors, *Semin Thromb Hemost* 2003;29:3-8.

Otten HM et al. Symptomatic venous thromboembolism in cancer patients treated with chemotherapy, *Arch Intern Med* 2004;164:190-4.

050

PT INR E APTT RATIO: VALUTAZIONI AL CAMBIO DEL SISTEMA ANALITICO

M.C. Straface¹, A. Calloni¹, G. Caiazzo¹, e. Angelaccio¹
¹Laboratorio Analisi, Osp. di Vimercate, Vimercate (MI), Italy

PT INR e APTT Ratio sono i test richiesti per il monitoraggio della terapia anticoagulante orale ed eparinica. Nel nostro laboratorio si è verificata la necessità di dover cambiare strumentazione. È stato necessario confrontare dati ottenuti con lo strumento in uso, ACL Advance (IL), e il nuovo strumento, BCS XP (Dade Bering) per valutare l'impatto sulla terapia dei pazienti in terapia anticoagulante o eparinica. Sono stati utilizzati 100 campioni di sangue intero raccolti in provette con citrato trisodico 109 mM. Gli strumenti si differenziano per le caratteristiche dei reagenti. BCS XP utilizza una tromboplastina estratta da placenta umana, ACLA un fattore tissutale ricombinante umano. Il reattivo per l'APTT su BCS XP è costituito da fosfolipidi vegetali e biossido di silicio, il reattivo su ACLA è costituito da fosfolipidi sintetici e acido ellagico. I campioni sono stati dosati contemporaneamente su entrambi gli strumenti. Le equazioni delle rette (sec. Passing e Pablock) BCS XP (y) vs ACLA (x) per PT INR e APTT Ratio sono rispettivamente:

$$y = 0.025 + 0.980 x$$

$$y = - 0.02 + 0.975 x$$

Per valori di INR fino a 3.5 l'accordo tra i due strumenti è buono. Per valori superiori a 4.5 i risultati divergono in modo non accettabile. Il cambio del sistema analitico per i parametri coagulativi va fatto se necessario ma preceduta da una valutazione di diversi fattori per una corretta terapia.

È stato considerato il problema della stabilità dei campioni: sono stati misurati su 20 campioni di plasma fresco a 0, e 8 h, il PT INR; e a 0, e 36 h l'APTT Ratio. Per il PT il test t-Student ha dato $p > 0.05$ tra gli intervalli considerati, per l'APTT $p < 0.05$.

La determinazione del PT può essere effettuata dopo 6 h dalla raccolta, mentre l'APTT va misurato entro 6h dal prelievo.

051

MONITORAGGIO DELLA TERAPIA EPARINICA IN CORSO DI ANGIOPLASTICA CORONARICA TRANSLUMINALE PERCUTANEA: DATI PRELIMINARI

M. Petronelli¹, F. Di Serio¹, P. Ranieri¹, L. Varraso¹, I. De Luca²

¹U.O. Patologia Clinica I, Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico, Bari

²U.O. Cardiologia Ospedaliera, Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico, Bari

Introduzione. La somministrazione di eparina in corso di Angioplastica Coronarica Transluminale Percutanea (PTCA), indispensabile per il mantenimento dell'emostasi, può costituire un rischio di complicanze trombotiche o emorragiche per il paziente. Il tempo di coagulazione attivata (ACT) consente di monitorare la terapia eparinica a letto del paziente (POCT), quando si utilizzano elevate concentrazioni (>1 UI/mL) non valutabili con il test di tromboplastina parziale attivata (aPTT). Scopo del lavoro è stato quello di monitorare la terapia eparinica a media e bassa concentrazione (<1 UI/mL) con il sistema analitico HemoChron® ACT-"low range" (ACT-LR: ITC, NJ, USA) in pazienti sottoposti a PTCA e definire i range di ACT-LR corrispondenti ai livelli di terapeutici di eparina.

Materiali e Metodi. Per la misura dell'ACT, campioni di sangue intero erano raccolti da 16 pazienti sottoposti a PTCA (età media (SD) = 69 (8) aa; 13 maschi), prima della somministrazione di eparina standard (5000 UI), e nei successivi 5 e 30 minuti. 3.5 mL di sangue intero erano raccolti, agli stessi intervalli di tempo, in separate provette vacutainer contenente sodio citrato (109 mM) e l'attività anti-fattore Xa era determinata con metodo cromogenico (Heparin; IL, Lexington, USA).

Risultati. I valori (n. 80) relativi all'ACT e all'anti-fattore Xa erano compresi tra 139-390 sec. e 0-0.93 UI/mL rispettivamente: $r = 0.78$ (95% IC: da 0.58 a 0.89), $p < 0.0001$.

Di seguito sono riassunti i risultati dell'ACT-LR (sec) e dell'anti-fattore Xa (UI/mL) espressi come media (DS) ai differenti intervalli di tempo: basale: ACT-LT = 187(63), anti-fattore Xa = 0.01 (0.18); 5 min: ACT-LT = 274 (52), Anti-fattore Xa = 0.67 (0.18); 30 min: ACT-LT = 256 (66), Anti-fattore Xa = 0.54 (0.3). **Conclusioni.** I valori di ACT-LR, determinati ai differenti intervalli di tempo correlano con i livelli di attività di anti-fattore Xa. I nostri dati preliminari suggeriscono che il metodo ACT-LR può essere un utile strumento nel monitoraggio della terapia eparinica a bassa e media concentrazione al fine di minimizzare gli eventi ischemici e le complicanze emorragiche in corso di PTCA.

Bibliografia

Tremey B, Szekely B, et al. Anticoagulation monitoring during vascular surgery: accuracy of the HemoChron low range activated clotting (ACT-LR). *British J Anaesthesia* 2006;97(4):453-9

052

PROTEIN Z DEPENDENT PROTEASE INHIBITOR (ZPI) AND PROTEIN Z IN PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE PATIENTS

F. Cesari¹, F. Sofi¹, Y. Tu⁴, G. Pratesi², C. Pratesi², G.F. Gensini³, R. Abbate¹, S. Fedi¹, G.J. Broze⁴

¹Department of Medical and Surgical Critical Care, Thrombosis Center, University of Florence, Italy

²Unit of Vascular Surgery, University of Florence, Italy

³Don Carlo Gnocchi Foundation, Impruneta, Florence, Italy

⁴Division of Hematology, Washington University, School of Medicine, St. Louis, MO, USA

Introduction. Protein Z is a vitamin K-dependent protein that serves as a cofactor for the inhibition of factor Xa through the serpin protein Z dependent protease inhibitor (ZPI). We have previously determined protein Z plasma levels in patients with peripheral arterial disease (PAD), but ZPI levels have not yet been reported. The aim of this study is to more fully assess the protein Z/ZPI system in PAD patients in order to clarify its role in this particular model of atherosclerotic disease.

Material and methods. We measured protein Z and ZPI in 60 PAD patients (48 M; 12 F) [median age: 73 (50-86) years] and in 60 healthy subjects comparable for age and gender. Protein Z and ZPI plasma levels were measured using home-made protein Z and ZPI immunoassays and a ZPI functional assay developed at the Division of Hematology of the Washington University, St. Louis, USA.

Results. Protein Z antigen and ZPI function were found to be significantly lower in PAD patients with respect to healthy controls [Protein Z: median 73.56 (range: 3.37-123.66)% vs. 98.5 (42.34-203.16)%, $p = 0.0001$; ZPI function: 83.30 (21.06-135.17)% vs. 96.91 (54.11-175.48)%, $p = 0.001$]. On the other hand, only a trend of significance for ZPI antigen was reported between patients and healthy controls [(ZPI antigen: median 90.82 (27.17-149.54)% vs. 93.14 (range: 48.98-171.29)%]. In order to evaluate the possible involvement of protein Z/ZPI system on the pathogenesis of PAD we analysed the relationship between these proteins and the clinical severity of the disease. A general linear model, after adjustment for age, gender, and traditional cardiovascular risk factors showed significant lower levels of ZPI function according to the Fontaine's stages [ZPI function, stage IIb: 90.16 (82.89-97.43)%; stage III: 57.69 (40.22-75.17)%; stage IV: 37.64 (10.36-64.92)%]. Finally, the whole population was grouped on the basis of the number of traditional risk factors, and a trend of decrease for Protein Z and ZPI antigen according to the number of risk factors was observed.

Conclusions. Our data show, for the first time, an association between protein Z/ZPI system and PAD, and suggest a potential role for this coagulation regulatory system in the occurrence and/or progression of the atherosclerotic disease.

053

ANTICOAGULANTE LUPICO (LAC) E SINDROME DA ANTICORPI ANTI FOSFOLIPIDI (APS): IMPORTANZA CLINICA DEI DIVERSI TEST DI LABORATORIOD. Cosseddu¹, S. Sciascia², L. Gallo¹, I. Canta¹, M.T. Bertero², L. Andriani¹¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, AO Ordine Mauriziano, Torino²Allergologia e Immunologia Clinica, AO Ordine Mauriziano, Torino

La diagnosi di APS richiede che un evento clinico (trombosi venosa e/o arteriosa o morbidità gravidica) sia associato alla presenza, confermata in due occasioni, di un anticorpo antifosfolipidi (aPL): LAC, anti cardiolipina (ACA), anti B2GPI. La presenza del LAC e la positività multipla degli aPL sembrano essere maggiormente associate alla diagnosi di APS, mentre non è noto in quale misura i diversi test utilizzabili per evidenziare il LAC (DRVVT, KCT, SCT e STACLOT-LA) siano associati alla diagnosi di APS. Scopo. Valutare la frequenza di associazione dei vari test per la ricerca del LAC, della positività multipla degli aPL e del loro titolo, con la diagnosi di APS.

Pazienti e metodi. 3088 soggetti nei quali è stata ricercata la presenza degli aPL (LAC mediante DRVVT, KCT, SCT e STACLOT-LA; ACA e B2GPI IgG e IgM) nel periodo 2004-2006. Il rischio relativo (OR) della diagnosi di APS è stato calcolato mediante analisi di regressione logistica e la sensibilità e specificità è stata calcolata mediante le curve ROC.

Risultati. In 200 soggetti (6.5 %) la ricerca del LAC risultava positiva in 2 occasioni e, di questi, 72 (36 %) pazienti ricevevano diagnosi di APS. In 425 soggetti (13.8 %) erano presenti, in 2 occasioni, aPL (ACA e/o B2GPI) a medio-alto titolo in assenza di LAC e di questi solo 4 (0.9 %) ricevevano la diagnosi di APS. La prevalenza di positività dei singoli test LAC nei pazienti con APS era: SCT 91.6 %, KCT 91.6 %, STATCLOT-LA 73 %, DRVVT 62.5 %. Gli OR per la diagnosi di APS calcolati per ciascun test LAC erano: STATCLOT-LA 6.6, DRVVT 5.7, SCT 0.93, KCT 1.24. La doppia positività STATCLOT-LA e DRVVT possedeva la migliore specificità (82 %) per la diagnosi di APS. Tra i soggetti LAC positivi, la ricerca di ACA e B2GPI era positiva rispettivamente nel 59 (n. 118) e nel 37.5% (n. 75) e gli OR per la diagnosi di APS calcolati per ogni livello di titolo anticorpale (basso, medio, alto) di ACA e B2GPI erano: IgM ACA 1.66; IgG ACA 2.68; IgM B2GPI 2.33; IgG B2GPI ns

Conclusioni. La positività del LAC si conferma come il test più fortemente associato alla diagnosi di APS. I test STACLOT-LA e DRVVT si sono rivelati i più specifici per la diagnosi di APS, mentre viene confermato che la positività multipla di aPL aumenta il rischio di APS.

054

INDAGINE SERIATA SULLE VARIAZIONI DEL D-DIMERO IN PAZIENTI RICOVERATI IN LUNGODEGENZAM. Giovagnoli¹, I. Berni¹¹Lab. di Analisi Chimico Cliniche, Casa di cura Villa Immacolata, S. Martino al Cimino, Viterbo

Il D-Dimero è un test di coagulazione impiegato per escludere la presenza di TEV (tromboembolismo venoso), che ha un alto valore predittivo negativo, infatti sembra essere utile solo se normale, se cioè risulta patologico non si può fare diagnosi di TEV perché i valori del D-D. aumentano in corso di varie patologie (infezioni acute e croniche, scompenso cardiaco, diabete, età avanzata, ecc.).

Scopo del lavoro è quello di verificare in pazienti con rischio di TEV:

- se è possibile con controlli seriatati in soggetti che presentino valori di D-D. già alterato, formulare una prognosi di rischio trombotico aumentato;

- se la terapia profilattica incide sulle concentrazioni del D-D.

Per questo studio sono stati presi in considerazione 99 pazienti in lungodegenza riabilitativa con le seguenti patologie: scompenso cardiaco, insufficienza respiratoria, infezioni, neoplasie, immobilizzazione, TEV pregresso, diabete, traumi ed interventi chirurgici.

I pazienti sono stati sottoposti a 3 prelievi: il 1° al momento del ricovero, il 2° e il 3° rispettivamente dopo 15 e 30 giorni. Su questi prelievi sono stati eseguiti i seguenti tests: D-D., fibrinogeno, PCR e VES. La determinazione del D-D. è stata effettuata con Vidas D-Dimer New, un test che utilizza la tecnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Essay) che associa il metodo immunoenzimatico ad una rivelazione in fluorescenza.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

- il D-D. aumenta sempre in caso di TVP;
- la terapia anticoagulante migliora nettamente i valori di D-D. in pazienti con TVP;
- la terapia profilattica anticoagulante sembrerebbe ininfluenza sulle concentrazioni di D-D.;
- il D-D. aumenta sempre in caso di infezioni.

Le conclusioni che si possono trarre sono le seguenti:

- il D-D. anche se già patologico è comunque utile come test prognostico per rischio trombotico aumentato, infatti valori già alterati si innalzano ancora di più in caso di TEV.
- in pazienti con polipatologie, non è significativo preso come unico valore; può invece dare importanti indicazioni su stato settico e rischio di TEV con determinazioni seriate durante al degenza.

Bibliografia

Kearon C, Ginsberg JS, et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-Dimer testing. *Ann Intern Med* 2001;135:108.

055

UN CASO DI AVVELENAMENTO TRANSCUTANEO DA SUPERWARFARINA (RUOLO E RESPONSABILITÀ DEL LABORATORIO)

V. Rocco¹, T. Catalano¹, M. Fumi¹, G. Gaudenzi¹, N. Sarracco¹, M. Simeone¹

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

I rodenticidi superwarfarinici sono stati introdotti dopo che era stata notata una resistenza nei ratti alla Warfarina. Essi hanno potenza 100 volte superiore alla Warfarina ed una emivita da 20 a 60 giorni. Le esposizioni possono essere intenzionali (tentativi di suicidio, Sindrome di Munchausen), accidentali o sconosciute. Pochi sono i casi riportati in cui il tipo di esposizione alla superwarfarina è sconosciuto.

Presentiamo il caso di un paziente di 37 anni valutato in PS nella notte del 1-1-2008 per gengivorragia senza anamnesi per diatesi emorragica con PT (INR >10) e aPTT (ratio 2,4) allungati. Durante il turno notturno non veniva eseguito il test di miscela. Il Medico di PS ricoverava il paziente in Medicina Generale dopo terapia con 1 fiala di Vit. K in 100 cc di soluzione fisiologica. Una successiva valutazione del mattino faceva rilevare un miglioramento del PT e aPTT e faceva ritenere al Medico di Laboratorio che la terapia fosse stata efficace e che quindi il paziente fosse in TAO non riportata in anamnesi. Una successiva valutazione pomeridiana faceva rilevare un nuovo allungamento del PT (INR 3,2) e aPTT (ratio 1,5). L'esecuzione del test di miscela con correzione completa orientava per deficit di Fattore/i e la valutazione dei Fattori Coagulativi faceva rilevare un deficit dei Fattori Vitamina K-dipendenti (FIX 10%; FX 5%; FII 5%; FVII <1%) con normali livelli di FV e FVIII.

Sulla scorta di questi dati veniva eseguita una ulteriore valutazione anamnestica che, mentre confermava l'assenza di TAO, metteva in luce che il paziente aveva circa 15 giorni prima sparso del "veleno per topi". Mentre negava un'ingestione volontaria del prodotto (Broditop: Brodifacoum 0,005%), rivelava che tuta e guanti con cui era stato sparso il prodotto erano stati più volte usati senza essere lavati. Una prolungata terapia con Vitamina K prima IV 3 volte al giorno e poi OS per 3 mesi ha portato alla correzione della coagulopatia.

È importante per i medici essere a conoscenza che possono verificarsi coagulopatie secondarie alla tossicità da superwarfarine, anche senza una nota esposizione. Quando un paziente si presenta con sintomi di coagulopatia con una elevazione del PT e nessuna ovvia etiologia, i medici dovrebbero prendere in considerazione questa diagnosi.

056

FONTI DI VARIABILITÀ NELLA DETERMINAZIONE DEGLI ELETTROLITI

C. Ballabio¹, F. Cappellini¹, R. Falbo¹, P. Brambilla¹, P. Mocarrelli¹

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

Introduzione. Le procedure di controllo di qualità interno rivestono un ruolo fondamentale per garantire le specifiche di qualità di una determinazione analitica e per monitorare il corretto funzionamento di uno strumento.

Scopo del lavoro è stato valutare la frequenza con la quale i controlli sugli elettroliti superavano i limiti di accettabilità dettati dal sistema multiregole di Westgard adottato nel laboratorio dell'ospedale di Desio, comprenderne le cause e scegliere le procedure correttive più appropriate.

Materiali e metodi. Per un periodo di 3 mesi sono stati valutati su "Modular SWA di Roche" per Na, Cl, K, i risultati del Controllo di Qualità Interno (CQI) e le curve di calibrazione. È stato inoltre valutato l'impatto di due tipi di manutenzione (sostituzione delle resine del deionizzatore e sostituzione degli elettrodi) sui coefficienti di variazione (CV) e sul numero degli eventi di fuori controllo prima e dopo gli interventi.

Risultati. Na, Cl, K sono risultati fuori controllo rispettivamente 16, 6 e 7 volte, così suddivise: rispettivamente 11, 4, 5 volte in corrispondenza della sostituzione delle resine del deionizzatore, 3, 1, 1 volte in prossimità della manutenzione che prevedeva la sostituzione degli elettrodi. I restanti casi di "fuori controllo" (2 per Na, 1 per Cl, 1 per K) si sono distribuiti uniformemente nell'arco di tempo preso in esame.

Si è osservato inoltre che il CV sulle repliche dei controlli nel periodo precedente la sostituzione degli elettrodi (4 giorni) si attestava su valori sempre maggiori rispetto a quelli ottenuti nel periodo di 25 giorni successivo alla manutenzione.

Conclusioni. È stato dimostrato che le situazioni di "fuori controllo" si concentrano nei periodi appena precedenti gli interventi di manutenzione. La sostituzione delle resine incide maggiormente sul numero di situazioni di "fuori controllo", la sostituzione degli elettrodi influisce in maggior misura sul CV tra i risultati del CQI. Questi risultati suggeriscono di anticipare la sostituzione degli elettrodi e delle resine del deionizzatore.

Bibliografia

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; Approved Guidelines-Third Edition. CLSI document C24-A3, 2006.

057

PROGRAMMA DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ (VEQ) PER METALLI IN MATRICI BIOLOGICHE

M. Capelli¹, L.R. Incorvaia¹, P. Mimmi¹, C. Canali², E. Cariani², T. Trenti²

¹Gruppo VEQ, Programmi di Valutazione Esterna di Qualità, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna

²Laboratorio di Patologia Clinica, Tossicologia, Ospedale Civile S. Agostino-Estense, Modena

La determinazione di metalli in matrici biologiche riveste un ruolo fondamentale nel monitoraggio del rischio chimico. I programmi VEQ esistenti per questi analiti sono scarsi e pochi Laboratori vi aderiscono. Per rispondere alla necessità di maggiori garanzie di qualità del dato analitico, dal 2008 è stato implementato dal Policlinico S. Orsola-Malpighi un Programma VEQ in Tossicologia Occupazionale.

Metodi. Il programma comprende l'analisi di piombo (PbB) e cadmio (CdB) su sangue; rame (CuS), zinco (ZnS), alluminio (AIS) e selenio (SeS) su siero; cromo (CrU), nichel (NiU), cobalto (CoU) su urine. Sei campioni per ogni matrice biologica, derivati da materiali commerciali certificati, verranno distribuiti nel corso del 2008 ai 15 laboratori partecipanti. L'elaborazione statistica dei risultati comprende il calcolo dei valori aberranti basato sulla deviazione standard robusta, della media di consenso, della mediana, del CV%, dello z-score.

Risultati. I metodi utilizzati comprendevano: spettrometria ad assorbimento atomico con fornetto di grafite (G-AAS) o fiamma (F-AAS), plasma ad accoppiamento induttivo-massa (ICP-MS), diluizione isotopica (DI), metodi enzimatici o colorimetrici (E/C). Il numero medio di risposte e i risultati aberranti osservati per i primi due campioni erano: PbB 13 (1), CdB 8 (0), CuS 9 (1), ZnS 10 (1), AIS 5 (1), SeS 4 (0), CrU 10 (0), NiU 10 (2), CoU 9 (0). I risultati osservati ($\mu\text{g/L}$) per i singoli campioni erano: PbB: mediana (M) 26, CV 34.1% e M=392, CV 24.7%; CdB: M= 0.63, CV 33.4% e M=9.6, CV 56.1%; CuS: M= 1058, CV 13.4% e M= 2175, CV 16.8%; ZnS M=1275, CV 11.1% e M=920, CV 14.7%; AIS: M=9.5, CV 61.3% e M=105, CV 14.2%; SeS : M=63, CV 37.4% e M=144, CV 28.1%; CrU : M=19, CV 14.3% e M=1.02, CV 70.9; NiU: M=49, CV 14.7% e M=4.0, CV 32.6%; CoU: M=10; CV 20.2% e M=0.53, CV 78.2%.

Conclusioni. Per alluminio e selenio, dato l'esiguo numero di partecipanti, le valutazioni statistiche rappresentano semplicemente lo stato dell'arte. I valori di CV% più elevati sono stati osservati su campioni contenenti livelli prossimi al limite di sensibilità delle metodiche. Un'analisi dettagliata dei risultati complessivi del programma potrà contribuire alla standardizzazione del monitoraggio biologico dei metalli.

058

GESTIONE DELLE NON CONFORMITÀ PRESSO IL LABORATORIO ANALISI DI PIEVE DI CADORE

E. Bertagnin¹, L. Da Deppo¹, E. Zampol¹, A. Da Ronchi², A.M. Rocchi¹, T. Roncada¹

¹UOA Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Pieve di Cadore (BL)

²Ufficio Qualità, ULSS 1, Belluno

Il Laboratorio Analisi di Pieve di Cadore ha intrapreso un percorso che ha portato nel 2005 al conseguimento della Certificazione di qualità conforme alla norma UNI EN ISO 9001:2000. Per poter misurare e monitorare processi e prodotti, come la norma richiede, sono state intraprese attività di controllo, tra cui lo studio di un sistema di raccolta e analisi delle non conformità (NC) ovvero la presenza di difformità da quanto previsto in specifiche, contratti o procedure.

Materiali e Metodi. Inizialmente le NC venivano rilevate e descritte per esteso ma registrazione e analisi risultavano troppo indagative. Per consentire una più rapida registrazione e una più facile analisi, le NC e le azioni correttive (AC) più frequenti sono state codificate e inserite in una tabella per ogni area di processo. Per registrare le NC non codificate è stato creato un apposito modulo. L'adozione di questo sistema ha semplificato la registrazione delle NC ma non l'analisi finale. E' stato quindi studiato un foglio di calcolo excel che contenesse tutte le informazioni della precedente tabella e che permettesse l'analisi finale delle NC in maniera più immediata. Si sono creati più fogli di calcolo uno per ogni area interessata; ogni foglio permette ad ogni operatore nella propria area di registrare in un unico file in rete le NC rilevate, suddivise per giorno e reparto e le relative AC. E' possibile così avere immediatamente un conteggio giornaliero, mensile per reparto e mensile totale delle NC. L'analisi delle NC così raccolte è eseguita dal Responsabile Gestione Qualità alle scadenze stabilite.

Risultati/Conclusioni. Con l'adozione del foglio di calcolo il carico di lavoro dovuto alla raccolta delle NC da parte degli operatori si è di molto ridotto e l'analisi dei dati è più rapida ed efficace con la possibilità di riportarli in tempo reale attraverso dei grafici.

Bibliografia

Sistemi di gestione per la qualità Requisiti UNI EN ISO 9001:2000.

Bizzarri G. Il sistema qualità ISO 9000 per i laboratori clinici 1999.

Bizzarri G, Plebani M. I processi del laboratorio clinico nell'ottica del sistema (ISO 9001:2000) dell'azienda sanitaria 2004.

Plebani M. Sistema qualità ed accreditamento nel laboratorio clinico 1998.

PG 14 Gestione NC Laboratorio Analisi Pieve di Cadore.

059

**INDAGINE SULLA SODDISFAZIONE DELL'UTENTE
COME OPPORTUNITÀ DI MIGLIORAMENTO**

S. Gelsumini¹, C. Pozzato¹, S. Altinier¹, L. Sciacovelli², A. D'Osualdo¹, M. Plebani¹

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

²Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

La soddisfazione dell'utente è uno degli elementi essenziali per orientare le azioni di governance dell'organizzazione. Gli strumenti ed i processi di misurazione della soddisfazione degli utenti devono essere pianificati in modo da ottenere misure reali, comprendere i fattori che sono realmente critici per l'utente, identificare le azioni ed i piani di intervento i cui effetti possono essere misurati e monitorati nel tempo. La valutazione della soddisfazione dell'Utente ambulatoriale che accede al nostro Servizio viene valutata ogni due anni mediante distribuzione di un questionario. Nella stesura del questionario sono inserite domande per la verifica di azioni attuate per il miglioramento di aspetti critici o non soddisfacenti rilevati nelle precedenti indagini o per valutare l'introduzione di nuove modalità operative.

Scopo di questo lavoro è riportare i risultati ottenuti dall'indagine sulla qualità percepita dall'utente ambulatoriale del nostro Servizio. Sono stati raccolti 774 questionari (distribuiti nel periodo dicembre 2007-gennaio 2008) che risulta un campione significativo degli utenti afferenti al Servizio. Dall'elaborazione dei dati risulta che: gli utenti sono prevalentemente donne (64%); il 13% afferiva per la prima volta; il 44% si rivolge al Servizio perché ne ha fiducia ed il 35% su indicazione del proprio medico; il 75% non conosceva la possibilità di eseguire il prelievo tra le 13.30 e le 14.30 ed il 92% la ritiene un'opportunità utile.

Inoltre, rispetto alla precedente indagine svolta nel 2005, risultano migliorati i seguenti aspetti:

- competenza professionale eccellente (da 40 % a 80 %);
- tempi d'attesa eccellenti in fase di accettazione (da 12 % a 45 %), prelievo (da 21 % a 51 %) e ritiro referti (da 17 % a 56 %);
- qualità del servizio migliorata (da 33 % a 38 %).

Le aree di miglioramento evidenziate riguardano principalmente la necessità di spazi più ampi, la scomodità del parcheggio, la necessità di aumentare il numero di sportelli e il personale.

I risultati dimostrano che gli interventi adottati dal Servizio per migliorare la qualità percepita hanno prodotto un giudizio positivo dell'utente dimostrando che gli sforzi attuati per venire incontro alle attese sono stati opportunamente articolati con le opportunità organizzative.

060

**VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE
DEI METODI PER LA MISURA DI Tg, AbTg E AbTPO:
RISULTATI DEL PROGRAMMA DI VEQ Tg-CHECK**

A. Iervasi¹, S. Giovannini¹, A. Pilo¹, S. Masini¹, M. Scarlattini¹, G. Iervasi¹, G.C. Zucchelli¹

¹CNR, Istituto di Fisiologia Clinica, Pisa

Il programma di Valutazione Esterna di Qualità Tg-check è attivo da 5 anni; i laboratori nel ciclo 2008 sono 110 e circa il 70% di questi partecipa trasmettendo i risultati via internet collegandosi al sito web dei programmi di VEQ EQAS- CNR (<http://eqas.ifc.cnr.it>).

Dall'analisi cumulativa dei risultati dei 6 esercizi di controllo del ciclo 2007 risulta che i metodi per la misura della Tireoglobulina (Tg), nonostante l'uso di standard calibrati verso la stessa preparazione di riferimento (1° IRP CRM 457), continuano a produrre risultati molto diversi tra loro in particolare nei campioni contenenti anticorpi AbTg. In questi campioni, la variabilità totale (CV tra-laboratori, tra-metodi) osservata nella VEQ è molto elevata (74-83%) a causa dell'interferenza degli anticorpi endogeni nella misura della Tg; è noto infatti che, ad oggi, tutti i metodi risultano più o meno interferiti dalla presenza di AbTg nel campione e questo provoca l'allargamento delle differenze sistematiche tra metodi. Nei campioni negativi per AbTg, invece, le differenze sistematiche tra metodi si riducono notevolmente (CV tra-laboratori, tra-metodi 20-40%). Per quanto riguarda la precisione dei metodi (CV entro-metodo), nei campioni a concentrazione superiore a 1.5 ng/mL alcuni metodi (DPC Immulite, Roche Modular/Electsys, Beckman Access) raggiungono variabilità buone (CV 6-13%) mentre con gli altri metodi si osservano CV molto alti (15-39%); nei campioni a concentrazione inferiore a 1 ng/mL soltanto il metodo Beckman Access che ha una elevata sensibilità analitica (0.01 ng/mL) riesce a misurare la Tg con buona precisione (CV= 11%). I metodi per la misura degli anticorpi anti-Tg (AbTg) e anti-TPO (AbTPO), pur nominalmente calibrati verso gli stessi standard di riferimento (WHO 65/93 e WHO 66/387), producono risultati molto diversi tra loro e difficilmente confrontabili (CV=55,4-85,2% per AbTg e CV=32-65,4% per AbTPO). Del resto si osserva che anche i valori di cut-off sono molto diversi da metodo a metodo (da 12 a 115 UI/mL per AbTg e da 8 a 6 UI/mL per AbTPO). La normalizzazione dei risultati per il cut-off rende più uniforme il comportamento dei metodi e permette di evidenziare comportamenti anomali. Tuttavia anche in questo modo le differenze sistematiche tra metodi restano molto elevate indicando che probabilmente la scelta dei cut-off per i vari metodi non è correlata alle misure.

061

MIGLIORAMENTO DEL METODO DI RILEVAZIONE DELLE NON CONFORMITÀ DEL CAMPIONE BIOLOGICO

R. Marchetti¹, G. Ballabio¹, A. Mastroianni¹, V. Motta¹, P. Picco¹, M. Ranzani¹, F. Sozzani¹, C.S. Vismara¹, D. Morelli¹

¹Unità Operativa Medicina di Laboratorio 1, Dip. Oncologia Sperimentale e Lab., Fondazione IRCCS Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano

Le non conformità (NC) dei campioni biologici relative alla fase pre-analitica hanno un notevole impatto sulla accuratezza del dato analitico e possono portare al rigetto del campione ritardando una eventuale decisione medica (1). Il laboratorio può cercare di ridurre il numero agendo indirettamente sulla fase pre-analitica, mediante la promozione di procedure interne ben codificate. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di definire una procedura standardizzata che permettesse una facile e mirata gestione di tutte le NC da parte del personale. Operativamente si è seguito questo schema:

- riportare manualmente le NC
- individuare le NC più frequenti e attuare una procedura comune del loro trattamento
- definire sigle di refertazione per le NC più frequenti da inserire nel SIG (sistema informatico di gestione)
- verifica della corrispondenza tra monitoraggio manuale e informatico

Sono state considerate le 2 più frequenti NC: campione scarso (CS) e campione emolizzato (CE). Si è rilevato che su un numero totale di 85 NC riportate manualmente, 78 sono state riportate anche nel SIG per una percentuale pari al 92%. Questi dati indicano che la comparazione tra registrazione cartacea ed informatica ha dato esito positivo e che quindi la

procedura proposta è stata recepita e applicata da tutto il personale in modo corretto e unanime. Inoltre l'utilizzo del SIG rende l'elaborazione delle NC immediata da parte del responsabile della qualità (RGQ) consentendogli di inoltrare tempestivamente il report delle NC ai reparti. Con i primi risultati, le relative segnalazioni e la collaborazione con il personale infermieristico e medico, si è potuto constatare una riduzione degli errori e quindi un positivo impatto sulla gestione della qualità dell'iter pre-analitico e analitico dei campioni biologici.

Bibliografia

1. Graziani MS et al. Le non conformità del campione: modalità di registrazione e specifiche di qualità. *Biochim clin* 2007;31(3):205-8.

062

DEFINIZIONE DEI VALORI CRITICI CON NECESSITÀ DI COMUNICAZIONE PER INTERVENTO CLINICO

R. Marozzi¹, G. Carusillo¹, P. Magatelli¹, F. Lanzini¹, B. Valloncini¹, G. Campagnari², M. Romessis³, G. Alessi⁴

¹Lab. Iseo, A.O. Chiari (BS), Italy

²Med. Iseo, A.O. Chiari (BS), Italy

³Chir. Chiari, A.O. Chiari (BS), Italy

⁴Ost. Gin. Iseo, A.O. Chiari (BS), Italy

Il riscontro nel corso della seduta analitica di risultati ritenuti critici (di panico), che implicano la necessità di intervento clinico immediato sul paziente per evitare gravi rischi, è gestito con un servizio d'assistenza con la loro comunicazione al medico richiedente o al paziente.

La definizione dei dati e dei loro limiti era stata eseguita in modo unilaterale dal laboratorio vari anni fa, sulla base di informazioni generali raccolte dalla letteratura e dal parere di alcuni medici.

È stato costituito un Gruppo di Lavoro composto da laboratori e clinici, per la discussione guidata di testi, bibliografia e pareri di altri colleghi, allo scopo di condividere e definire i nuovi valori di panico. Il Gruppo è stato accreditato ECM/CPD come attività di formazione sul campo.

Durante gli incontri, terminati all'inizio dell'anno, sono state discusse le analisi eseguite presso il laboratorio, secondo le specialità di classificazione (biochimica e tossicologia, ematologia, coagulazione, microbiologia, sierologia, immunoematologia) e la tipologia del paziente (chirurgico, medico, ostetrico, pediatrico).

Nella definizione dei limiti di panico il Gruppo di Lavoro ha preso in considerazione oltre ai dati analitici, anche la praticabilità delle scelte sia nell'ambito organizzativo del laboratorio che della struttura ospedaliera in cui sarebbero state applicate.

Sono state valutate sia le analisi in regime di routine, ma anche d'urgenza, per le quali fosse opportuno l'avviso immediato.

Tra le circa 400 analisi discusse ne sono state individuate 50, ad esse se ne affiancano altre 10, dove l'assistenza non è prevista, perché le caratteristiche organizzative del laboratorio genera un TAT molto ridotto, permettendo così la consultazione in reparto dei risultati in tempi rapidi.

Il prodotto finale è stato l'invio a tutti i reparti, di una nuova revisione del documento riguardante la rilevazione e la comunicazione dei dati di panico.

Il documento è strutturato in tabelle, per un uso efficace nei settori analitici del laboratorio e riporta oltre ai valori di panico, indicazioni sulle motivazioni delle scelte adottate.

- Dep. Clinical Lab. Ohio State Univ. Medical Center – Notification of critical values.

063

**EFFETTO DELLA COMUNICAZIONE TRA
LABORATORIO ANALISI E REPARTI DI DEGENZA
PER UNA RIDUZIONE DEI COSTI**

A. Montani¹

¹Struttura Laboratorio Analisi di Casalpusterlengo e
Codogno, A.O. Provincia di Lodi

Da sempre contrario al perseguimento della riduzione dei costi attraverso l'accentramento perché l'allontanamento della produzione del dato da un contesto clinico conduce di fatto ad una crescente inappropriata della richiesta (1), nel corso del 2007, ho cercato di pervenire ad una condivisione di protocolli con i colleghi dei vari reparti per costituire standards specifici di richieste di esami routinari numericamente limitati al confronto con quelli in essere (2).

A tale scopo, sono stati condotti incontri, a cadenza mensile, per la definizione di detti protocolli ed i cui risultati, a distanza di un anno, vengono di seguito riportati. I dati sono riferiti al confronto tra i corrispondenti trimestri del 2007 e 2008.

Il protocollo concordato con la pediatria a gennaio 2007 ha ridotto gli esami in regime di routine da 1523 a 1312 (-14%); la cardiologia che già aveva presentato, a seguito di un protocollo operativo concordato nel 2006, una riduzione su base annuale del 36%, ha messo in mostra una sostanziale invariabilità. Infine, la rianimazione, contattata nel mese di marzo dello scorso anno, ha mostrato un decremento nella routine da 1623 a 1239 esami (-24%). Analogamente, per il II trimestre, l'ortopedia, incontrata in aprile, presenta una riduzione di richieste interne da 3764 a 2792 (-26%); la chirurgia, incontrata a maggio, passa da 5789 a 4995 esami (-14%) mentre la medicina, incontrata a giugno, presenta, in controtendenza, un incremento di circa il 12% (17311 esami contro 15389).

Nonostante l'ultimo dato, che si presenta, comunque, del tutto anomalo nella sua unicità, ritengo che quella proposta sia la strada oggi più logica e doverosa per contenere le spese di laboratorio giungendo contestualmente ad una diagnosi clinica più efficace pur attraverso richieste ridotte ma più consone all'identificazione di una patologia.

Un ulteriore sforzo può infine essere condotto per un progressivo "svecchiamento" di metodiche obsolete e rimpiazzabili con esami più attuali che dovrebbero ridurre il numero e, di conseguenza, risultare in una significativa riduzione dei costi.

Bibliografia

1. Montani A, *Biochim Clin* 2006;30:274.
2. Montani A, *Clin Chem Lab Med* 2007;45:A153.

064

**MANUTENZIONE E ATTIVITA' DEL SISTEMA
QUALITA' DELL'UNITA' OPERATIVA:
"LABORATORIO DI ANALISI CHIMICO CLINICHE ED
EMATOLOGICHE O.C.M. VERONA"**

M. Nicoli¹, P. Rizzotti¹

¹Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed
Ematologiche, O.C.M., Verona

Scopi. Il nostro Laboratorio è accreditato CPA dal 1966 e certificato ISO 9001-2000 dal 2002.

Per un continuo miglioramento della Qualità e per una regolare manutenzione di tutti i Processi e della Documentazione correlata, nell'ottobre 2007 il nostro Laboratorio ha riorganizzato il Sistema Qualità.

Metodologia. È stato nominato un nuovo Responsabile della Qualità ed è stato ricostituito il Gruppo Operativo Miglioramento della Qualità (GOMiQual) formato da 25 persone in rappresentanza di tutte le figure professionali. Le finalità del GOMiQual sono:

disseminazione di tutta la documentazione inerente accreditamento e certificazione, azione di collettore di tutte le richieste di chiarimento e ogni altra necessità inerente le problematiche della qualità dell'accREDITAMENTO e della certificazione, coordinamento di tutti i settori nell'affrontare e risolvere i problemi inerenti accreditamento e certificazione, produzione dei documenti necessari per il mantenimento della Qualità.

Risultati. In dieci mesi di attività del GOMiQual sono stati prodotti i seguenti risultati:

Sono state convocate 18 riunioni di programmazione.

Su 160 documenti esistenti (istruzioni e procedure), 21 sono nuovi documenti, 75 sono nuove revisioni, con una percentuale di rinnovo del 58%. Tra questi il Manuale della Qualità, il Manuale del Servizio Esami Urgenti, il Manuale delle Regole del Sistema Esperto di Validazione.

Sono state superate 4 visite ispettive (visita ispettiva interna, CPA, ISO 9001 2000, Autorizzazione Regionale).

Sono state distribuite ai reparti di degenza 4 circolari informative intitolate "Lettera dal Laboratorio".

Sono stati espletati 6 Audit Interni.

Sono stati organizzati 2 Eventi Formativi ECM.

Considerazioni conclusive. Viene riportato il report della visita ispettiva CPA:

"This is an excellent laboratory with a strong ethos of quality management. The Hospital is ISO 9001 certificated and has a management system driven by the need for continual improvement.

The quality management system is very well developed and maintained by an enthusiastic Quality Manager. The laboratory quality system links in to the overall hospital quality system with an excellent system of incident reporting and continual improvement".

Bibliografia

Il Sistema Qualità nelle Aziende Ospedaliere: Raffaele Montefusco.

065

MULTICENTRE COMPARISON OF BNP AND NT-PROBNP IMMUNOASSAYS: THE CARDIOORMOCHECK STUDY

C. Prontera¹, M. Zaninotto², S. Giovannini¹, G.C. Zucchelli¹, A. Pilo¹, M. Plebani², L. Sciacovelli⁴, A. Clerico³

¹Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, CNR Istituto di Fisiologia Clinica, Pisa

²Dipartimento di Medicina di laboratorio, Policlinico Ospedale-Università, Padova

³Scuola Superiore S. Anna, Pisa

⁴Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

In order to evaluate the differences in analytical performance and clinical results of the most popular BNP and NT-proBNP immunoassays, a multicentre collaborative study, based on an external quality assessment scheme called CardioOrmocheck, have been organized and carried out in Italy since January 2005.

About 90 Italian laboratories were involved in the 2005-2007 cycles, while 112 laboratories took part in the 2008 cycle (from January to May 2008). In total, 28 samples with different BNP/NT-proBNP concentrations were prepared and measured by all participant laboratories for a total of 2354 determinations.

The mean total variability for BNP (50.6 CV%) was greatly higher than that for NT-proBNP (8.4 CV%). The mean variability due to the systematic difference between-methods (46.4 CV%) included the predominant part of total variability observed for BNP, resulting on average 84% of total variability, being the within-method variability on average 20.2 CV%. On the contrary, for NT-proBNP assay the within-method variability (7.3 CV%) represented the greater part of total variability (on average 75%), while the between-methods variability was smaller (4.1 CV%). Imprecision around the cut-off values showed marked differences among methods. Only the two ECLIA methods for NT-proBNP showed imprecision profiles ≤ 10 CV% around the cut-off values (i.e. about 100-150 ng/L), while Dimension method for NT-proBNP and Access and ADVIA Siemens for BNP (cut-off value about 50 ng/L) showed imprecision below 20% and the other immunoassays worse imprecision values. Moreover, BNP immunoassays are affected by large systematic differences (on average 2.7 folds between Access and ADVIA Centaur methods), while the agreement between NT-proBNP methods was better (on average 1.2 folds between Dimension and ECLIA on Elecsys platform methods).

The present study demonstrates that there are marked differences in analytical characteristics and clinical results among the most popular commercial methods for BNP and NT-proBNP assay. As a result, clinicians should give great care to compare results obtained by different laboratories, especially when different methods are used. Furthermore, our findings confirm that it is necessary a better standardization of immunoassay methods, especially for BNP assay.

066

FASE PRE-ANALITICA: MONITORAGGIO DEL TRASPORTO CAMPIONI

L. Sciacovelli², A. Tasinato¹, G. Vecchiato¹, A. Pinato¹, D. Faggian¹, M. Zaninotto¹, M. Plebani¹

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

²Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

Evidenze scientifiche dimostrano che gli errori imputabili alla fase pre-analitica si verificano anche in attività svolte al di fuori del laboratorio. Tuttavia queste evidenze sono scarsamente tenute in considerazione nei progetti di consolidamento dei laboratori e nelle procedure operative che precedono la fase analitica. Sono inoltre carenti indicatori di qualità pre-analitica basati su criteri oggettivi.

Viene riportato il progetto, in fase di sperimentazione, sviluppato dal nostro Servizio che ha l'obiettivo di monitorare la fase di trasporto dei campioni, relativamente al tempo e alla temperatura, al fine di identificare le criticità e le opportune azioni correttive.

Le fasi pianificate sono:

- individuazione di contenitori conformi alle direttive legislative
- formalizzazione della procedura
- implementazione di un software per la rintracciabilità del processo
- sensibilizzazione e formazione del personale coinvolto
- attuazione graduale del progetto sulla base della provenienza dei campioni: a) ambulatorio prelievi interno all'Azienda; b) unità operative interne all'Azienda; c) punti prelievo distrettuali ed ospedali afferenti all'ULSS 16; d) Ospedali ed Enti esterni; e) Ospedali che richiedono un'acquisizione di prestazione.

Nella fase sperimentale è stata data priorità ai campioni provenienti dalle sedi esterne all'Azienda e per le quali il laboratorio svolge un ruolo di responsabilità per la formazione del personale e il monitoraggio delle attività (punto c).

I risultati preliminari (gennaio-luglio 2008) relativi ai punti prelievi distrettuali ed ospedali afferenti all'ULSS 16 dimostrano che il numero di trasporti effettuati è 1671 dei quali 207 (12,4%) sono risultati non conformi (9,1% per temperatura; 3,0% per mancata attivazione del sistema di rilevazione della temperatura; 0,2% per allungamento dei tempi). Il trattamento delle non-conformità (NC, in questa fase preliminare, ha comportato la verifica dell'idoneità del singolo campione in rapporto ai test richiesti, con un notevole impegno di risorse umane.

L'analisi delle cause delle NC riscontrate ha evidenziato come le criticità siano riferibili ad una non corretta applicazione delle procedure, mentre sembrano adeguate le modalità e le specifiche individuate per l'implementazione del progetto.

067

CONSIDERAZIONI SULL'USO DI PIU' PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA QUALITA' (VEQ) IN UN LABORATORIO DI CHIMICA CLINICA

B. Sisi¹, S. Rapi¹, P. Pezzati¹, B. Salvadori¹, G. Messeri¹

¹Lab. Generale, Dip. Laboratorio A.O.U. Careggi, Firenze

Introduzione. Le Norme di Accredimento impongono ai Laboratori la partecipazione ad un programma di VEQ (1). Nella nostra struttura i test di Chimica Clinica sono abitualmente seguiti con 2 distinti programmi, quello dell'External Quality Assurance Services, (EQAS, Bio-Rad Lab, Ca, USA) e quello del Centro Regionale Riferimento della Regione Toscana (CRRT). Al termine di ogni ciclo vengono fornite alcune elaborazioni statistiche relative all'andamento dei test, l'EQAS fornisce i parametri della retta di regressione in grado di allineare i valori del laboratorio con quelli della media di consenso. Scopo del presente lavoro è stata la verifica della congruità delle indicazioni ottenute con i due programmi.

Materiali e Metodi. Sono stati utilizzati i report dei programmi di VEQ nov. 2007 - aprile 2008. I valori della retta di regressione forniti dall'EQAS per i diversi test sono stati utilizzati per calcolare i nuovi valori (Vc) rispetto ai valori strumentali dei controlli del CRRT, è stato poi confrontato il bias% riportato dal CRRT (Es%) con quello ottenuto rispetto alla media di consenso dal Vc (Ec%). Sono stati studiati: Na, K, Cl, Glu, Cre, Urea, PT, Alb, Ca, Mg, Fe, P, Ac Urico, TBil, Col, Trig, HDL, CK, ALT, AST, LDH, Ami, ALP, GGT. La valutazione sull'andamento dell'accuratezza delle risposte è stata fatta confrontando la somma dei valori assoluti del bias%; la significatività è stata valutata col t Test.

Risultati. L'applicazione dei parametri di regressione indicati dall'EQAS al programma del CRRT ha portato ad un miglioramento dell'accuratezza ($\Sigma Ec\% < \Sigma Es\%$) nel 29.2% dei test, ad un peggioramento ($\Sigma Ec\% > \Sigma Es\%$) nel 70.8%. Le variazioni sono risultate significative nel 37.5% dei test (miglioramenti significativi, 12.5%; peggioramenti 25%).

Discussione. Le indicazioni fornite dai programmi di VEQ dovrebbero essere generalizzabili consentendo al laboratorio di migliorare la propria accuratezza. L'analisi condotta mostra che quest'assunto potrebbe non rivelarsi completamente corretto. Le motivazioni di questa mancanza di generalità dell'informazione non sono facilmente comprensibili ma possono risiedere nella composizione dei gruppi partecipanti o nella mancanza di commutabilità dei materiali di controllo.

Bibliografia

1. Legge Reg. Accredimento 1999;8:22-3.

068

INDAGINE SULLE NON CONFORMITA' DEI CAMPIONI EMATICI PRESSO IL PRESIDIO OSPEDALIERO S. GERARDO DI MONZA

R. Brivio¹, M. Andreossi², V. Arosio¹, M.L. Carati¹, S. Falcioni³, M. Masotto², V. Minolfi¹, G. Vegetti¹, C. Villa², G. De Vito⁴

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, A.O. S. Gerardo, Monza (MI)

²Corso di Laurea in Infermieristica, Università Milano Bicocca, Monza (MI)

³Noemalife, Bologna (MI)

⁴Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università Milano Bicocca, Monza (MI)

Introduzione. Gli errori di laboratorio nella fase preanalitica producono campioni non idonei all'effettuazione di esami con importanti ricadute cliniche, economiche e medico-legali. Compito del laboratorio è il controllo e monitoraggio delle relative Non Conformità (NC) (1)

Scopo. 1) Analizzare le NC prodotte (01/2006-06/2007); 2) identificare le possibili cause di errore, mediante questionario somministrato agli infermieri; 3) stimare l'impatto economico e clinico delle NC.

Materiali e metodi. Le NC rilevate e refertate sono state estratte tramite il programma Calliope (Noemalife Bologna). Un campione randomizzato di 350 infermieri ha ricevuto un questionario anonimo autosomministrato per indagare la conoscenza delle procedure di raccolta dei campioni ematici e le abitudini in uso. Per stimare l'impatto economico si è calcolato il numero di esami non conformi ripetuti unitamente ai tempi di latenza al fine di ottenere un risultato valido, utilizzando come indicatori Troponina T (cTnT), "International Normalized Ratio" (INR), Potassio (K⁺). I dati sono stati elaborati con SPSS vers.14.

Risultati. Sono stati analizzati 1.693.554 campioni. Le NC sono significativamente più numerose nei campioni dei pazienti ricoverati (14792 NC, pari al 1,81%) -in particolare nelle aree critiche chirurgiche e pediatriche- rispetto a pazienti esterni (1090 NC, 0,18%), ambulatorio TAO (122 NC, 0,21%) e donatori (437 NC, 0,20%). La rispondenza al questionario è stata del 63%. La prevalenza di non conoscenza o non applicazione della procedura è risultata del 35,2%; la miscelazione energica viene eseguita fino al 24,4% dei casi; l'ordine delle provette non è rispettato nel 27,7%; il laccio è applicato per più di 2 min. nel 35,4%. In caso di NC il 57,2% di cTnT è ripetuto nelle 2 ore seguenti, mentre il 50,4% di INR entro 5 ore e il 37,6% di K⁺ entro 4 ore.

Conclusioni. La frequenza delle NC è comparabile con i dati di letteratura. Le aree critiche e pediatriche si collocano agli estremi superiori in misura fino a 10 volte rispetto ai pazienti esterni. Gli operatori necessitano di formazione specifica frequente. Il rilievo dell'impatto clinico ed economico fornisce utili indicazioni.

Bibliografia

1. Lippi G et al. Biochim Clin 2007;31:216-24.

069

**VEQ PROLARIT BIOCHIMICA CLINICA:
RIDEFINIZIONE DEI LIMITI DI ACCETTABILITÀ DEI
RISULTATI**A. Carobene¹, E. Guerra¹, F. Ceriotti¹¹Lab. di Standardizzazione per la Chimica Clinica,
Diagnostica e Ricerca San Raffaele S.p.A, Milano -
www.prolarit.it

I programmi di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ) PROLARIT, distribuiti da Bio-Rad Laboratories, usano come criterio di valutazione dei risultati l'ETa: massimo bias % tra risultato ottenuto e valore bersaglio (media di consenso dei laboratori con lo stesso principio analitico). Gli ETp (ET del PROLARIT), definiti all'inizio del progetto, sono basati per lo più sui criteri della variabilità biologica con alcune eccezioni per quei componenti il cui stato dell'arte era distante dagli obiettivi. Prendendo spunto dallo studio di Borsotti et al. (1) scopo del nostro lavoro è quello di verificare gli ETp alla luce dello stato dell'arte.

Sono stati utilizzati i risultati ottenuti su 12 sieri liofilati, per 24 componenti, dai 422 laboratori partecipanti alla VEQ PROLARIT di Biochimica nel 2007. Per ogni singolo risultato è stato calcolato l'ET %; la % dei laboratori il cui errore relativo al proprio gruppo di metodo risultava entro gli ETp; il valore di ET corrispondente al 70° percentile dei laboratori partecipanti (ETs = stato dell'arte). Infine si è valutata l'influenza della concentrazione sul valore di ETs.

Lo stato dell'arte è risultato molto distante dagli ETp per: Cloro: ETp 2,5%: 49% dei laboratori nei limiti; ETs: 4,4%
Calcio: ETp 3,5%: 53% nei limiti; ETs: 5,6%
Magnesio: ETp 4,1%: 39% nei limiti; ETs: 9,8%
Albumina: ETp 6,1%: 62% nei limiti; ETs: 7,7%
Sodio: ETp 2,5%: 65% nei limiti; ETs: 2,9%. [L'ETp era già basato sullo stato dell'arte].

Per tutti gli altri analiti, tranne la creatinina, gli ETs sono risultati inferiori ai ETp.

L'ETs è risultato dipendente dalla concentrazione per glucosio, urea, creatinina, potassio, acido urico, bilirubina, fosforo, AST e ALT. Nel caso di glucosio, creatinina, fosforo e potassio sui campioni a bassa concentrazione meno del 70% dei risultati rientrano nel limite di ETp. In conclusione i criteri di accettabilità dei risultati ottenuti sono in linea con lo stato dell'arte nella maggior parte dei casi. Solo per alcuni elettroliti i criteri basati sulla variabilità biologica sono risultati troppo stringenti e saranno quindi rivisti.

Bibliografia

1. Borsotti M, Quercioli M, Franzini C. Criteri per la valutazione dei limiti di accettabilità dei risultati dei programmi di VEQ. *Bioch Clin* 2008;32:260-68.

070

ERRORI PREANALITICI IN CINQUE ANNIA. Frezzotti¹, P. Strusi¹, D. Governatori¹, M. Tocchini¹¹Lab. Analisi, Ospedali Riuniti, Ancona

Scopo. Tenere sotto controllo la fase preanalitica valutando la tipologia e la frequenza degli errori permette di individuare le cause e quindi attuare azioni correttive con miglioramento dell'intero processo.

Materiali e metodi. Le diverse tipologie di errori, sono state codificate e sono state registrate nel LIS (Laboratory Information System); annualmente è stata calcolata la frequenza degli errori e sono state intraprese azioni correttive e di miglioramento per contrarre il numero degli errori più frequenti. Sono stati rielaborati i dati del periodo 2003-2007 e sono stati valutati gli effetti conseguenti alle azioni intraprese applicando il test $X < 2$.

Risultati. Considerando il numero delle richieste annue provenienti da tutti i reparti, la frequenza degli errori è passata dal 15,91% nel 2003 al 10,63% nel 2004, al 5,74% nel 2005, al 4,39% nel 2006 al 3,61% nel 2007. La contrazione maggiore si è osservata per gli errori relativi alla compilazione delle richieste, 10,68% nel 2003, 5,49% nel 2004, 1,72% nel 2005, 1,01% nel 2006 e 0,65% nel 2007 ($p < 0,001$). I campioni non pervenuti sono stati il 2,25% nel 2003, 2,02% nel 2004, 1,35% nel 2005, 1,04% nel 2006 ($p < 0,001$), stazionari a 1,02% nel 2007 ($p = 0,56$); i campioni emolizzati sono stati 1,20% nel 2003, 1,56% nel 2004 ($p < 0,001$), 1,44% nel 2005, 1,09% nel 2006 e 0,90% nel 2007 ($p < 0,001$). I campioni in difetto sono stati 0,89% nel 2003, 0,98% nel 2004, 0,64% nel 2005 ($p = 0,12$), 0,68% nel 2006 e 0,51% nel 2007 ($p < 0,001$). I campioni coagulati sono diminuiti significativamente dal 0,39% nel 2005, al 0,33% nel 2006 ($p < 0,001$). I campioni errati per dell'anticoagulante o modalità di trasporto sono diminuiti dal 0,17% nel 2003 al 0,12% nel 2004 ($p < 0,0001$), e dal 0,13% nel 2005 al 0,10% nel 2006 ($p < 0,0001$).

Conclusioni. Le azioni correttive intraprese, tra le quali l'inoltro al laboratorio di richieste computerizzate con campioni obbligati e gli incontri informativi periodici con gli operatori addetti al prelievo ed al trasporto dei campioni, hanno determinato il miglioramento della fase preanalitica con la riduzione dei tempi di accettazione e del numero degli esami non eseguiti e dei prelievi ripetuti

Bibliografia

Carraro P, Plebani M. Errors in Stat Laboratories: Types and Frequency 10 Years Later *Clin Chem* 2007;53:1338-1342.

071

APPLICAZIONE DELLE ULTIME LINEE GUIDA SIBioC PER LA GESTIONE DEL CONTROLLO DI QUALITÀ: STUDIO DEL MARGINE DI SICUREZZA E DELLE CONDIZIONI OTTIMALI DI CQI

C. Martini¹, F. Argentati¹, B. Brunella¹, F. Pecci¹, S. Secondini¹, P. Pauri¹

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

Da maggio 2008 abbiamo introdotto in laboratorio un nuovo sistema analitico integrato (Cobas 6000 Roche Diagnostics), consolidando i test di chimica clinica e immunometria su un'unica piattaforma.

Abbiamo progettato le modalità per tenere sotto controllo la fase analitica del nuovo sistema, implementando nella nostra realtà le ultime LG del GdL Controllo di Qualità SIBioC, pubblicate su BC 2008, vol. 32, n°2.

Per valutare le performance e il margine di sicurezza del processo abbiamo utilizzato in questa prima fase i CV e la correlazione con il sistema Modular Analytics dichiarati dalla ditta Roche. Abbiamo condotto lo studio su 22 test di chimica clinica, considerando per ciascun analita il livello di controllo con il CV più alto e abbiamo stimato il BIAS per quel livello, utilizzando la retta di correlazione del metodo, secondo la formula proposta da Westgard e dalle LG SIBioC.

Abbiamo calcolato il margine di sicurezza del processo analitico (metrica 6 sigma), prendendo come riferimento di ETa quello basato sulla variabilità biologica. Lo studio ha evidenziato che 14 analiti su 22 presentano una metrica >6, dimostrando quindi ottime performance ed elevato margine di sicurezza del metodo.

Abbiamo inoltre valutato l'errore sistematico critico e analizzato i risultati su grafici di curve di potenza, che ci hanno permesso di scegliere la migliore regola di CQI con probabilità di riconoscere l'errore >90% e probabilità di scartare serie corrette <5%: la maggior parte degli analiti sono controllabili con la regola 1_{3,5s} (n°controlli=2; n°ripetizioni=1). Abbiamo studiato le condizioni ottimali di CQI utilizzando anche le carte specifiche operative di processo (OPSpecs Chart) proposte da Westgard, confermando quanto ottenuto con i grafici delle curve di potenza.

In questo modo abbiamo ridisegnato il processo di CQI, scegliendo solo quelle regole statistiche di Westgard veramente efficaci, specifiche per ogni analita, così da avere segnalazioni di errore solo quando necessario ai fini dell'utilizzo clinico del dato analitico.

In una seconda fase, quando il sistema sarà a regime, effettueremo l'analisi utilizzando i nostri dati di CV e i risultati di BIAS che otterremo dalla partecipazione alla VEQ, in modo da "personalizzare" ulteriormente la scelta delle regole di CQI.

072

PROGRAMMA DI VEQ PER EMATOLOGIA DEL CENTRO DI RICERCA BIOMEDICA

L. Zardo¹, L. Sciacovelli¹, S. Secchiero¹, P. Solero², G. Guidi², M. Plebani¹

¹Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

²Centro di Riferimento in Ematologia e Coagulazione della Regione Veneto, Verona

Nel 2007 è nata una collaborazione fra il Centro di Ricerca Biomedica ed il Centro di riferimento in Ematologia e Coagulazione della Regione Veneto (Verona), per la gestione di Programmi di VEQ in questo campo, a cui aderiscono oltre 600 laboratori distribuiti su tutto il territorio nazionale. In particolare il programma di VEQ per Ematologia prevede l'invio di 12 campioni di sangue contenente leucociti ed eritrociti umani e piastrine di mammifero (cellule stabilizzate, sospese in matrice simile al plasma umano).

La gestione dei dati (inserimento e visualizzazione report) avviene esclusivamente su web (www.centroricercabiomedica.it) e l'elaborazione si avvale di un software appositamente studiato per la gestione di dati di VEQ, creato sulla base di specifiche indicate dai responsabili del programma.

La prestazione del laboratorio, per ogni singolo analita, viene valutata in termini di scostamento del risultato del laboratorio dal Valore Assegnato (mediana per gruppo strumento). Affinché una prestazione venga definita accettabile è necessario che lo scostamento del risultato del laboratorio dal VA sia inferiore all'errore totale ammissibile (Eta), definito sulla base della variabilità biologica.

In questo lavoro sono stati studiati i dati relativi ai campioni inviati nel ciclo 2007 e nei primi 2 esercizi del ciclo 2008 per un totale di 16 campioni di controllo. Per i parametri dell'emocromo (WBC, RBC, Hb, Hct, MCV e PLT) solo un'esigua percentuale di laboratori (2-3% per Hb, WBC, RBC e piastrine; 7-8% per Hct e MCV) non raggiunge gli obiettivi analitici definiti (Eta). Percentuali analoghe si ottengono da una valutazione indipendente dallo strumento (VA=mediana generale) fatta eccezione per Hct e MCV che, essendo strumento dipendenti, non si prestano ad una valutazione generale.

Per quanto riguarda la variabilità interlab, i CV% medi si aggirano sul 5% per WBC, Hct e MCV; 2% per RBC e Hb; 7-8% per PLT, in questo caso il CV% tende a ridursi (4-5%) per valori di piastrine superiori a 200x10⁹/L e ad aumentare (8-10%) per valori di piastrine inferiori a 150x10⁹/L.

I risultati dimostrano un buon livello di prestazione dei laboratori, una buona standardizzazione fra metodi ed una contenuta variabilità interlab per i principali sistemi diagnostici diffusi sul territorio.

073

THE ROLE OF BIOMEDICAL LABORATORY TECHNICIAN IN THE LIGHT OF NEW ISO STANDARDS

C. Ledda¹, M. Fiore¹, G. Oliveri Conti¹, M. Ferrante¹, S. Sciacca¹

¹Catania University, Dip G.F. Ingrassia, Hygiene and Public Health

The standards ISO for certification and accreditation have revolutionized the work of biomedical laboratory technician in routine laboratory.

The first approaches with the management system of quality were provided for introduction to quality standards ISO 9000 series since 1994. These rules propose a system of quality management, designed to monitor processes that are directed towards improving the effectiveness and efficiency of organization as well as customer satisfaction.

In recent years laboratory responsible had to deal with the technical standards on the management for laboratories analysis: the ISO 15189:2007 "Medical laboratories-Particular requirements for quality and competence" and ISO / IEC 17025:2005 "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories", they focus on the improvement of performances of the laboratory and in particular on quality of analytical result.

Biomedical laboratory technician, in this new perspective, plays a key role in accreditation of test and calibration methods. According to the old good laboratory practices was necessary that the laboratory measured their performances through external standards and tests, without specifying operator. Now, the new ISO standards provide a link between each test method and an operator.

In this new perspective, biomedical laboratory technician must choose the method of analysis, validate the method, assess the estimation of uncertainty of measurement and to control the statistical data. Furthermore, technician must verify internal and external repeatability by standards and Ring Test. It is also responsible for calibration and maintenance of all instruments of the laboratory.

So is of maximum importance that these operators must keep updated procedures and analytical techniques by continuous training and information.

074

CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO (CQI) IN EMATOLOGIA MEDIANTE IL CRITERIO DEI TRAGUARDI ANALITICI SECONDO LA VARIABILITA' BIOLOGICA PER LO STRUMENTO SYSMEX XE-2100®

G. Caramaschi¹

¹Lab. di Patologia Clinica, Az. Osp. Istituti Osp. "Carlo Poma", Mantova

Scopo. Secondo le linee guida per il CQI l'errore totale accettabile (ETa) dipende dalla variabilità biologica. In ematologia ciò si impone per non ricorrere a limiti forniti dal produttore non adeguatamente definiti. Allo scopo di stabilire i valori limite da assegnare al CQI per ciascun parametro dell'emocromo sono stati valutati: (ETa %) qualità necessaria di grado desiderabile; (CV %) imprecisione caratteristica misurata come coefficiente di variazione delle serie mensili; performance statistica delle regole di Westgard.

Metodo. L'operatività del CQI è misurata dalla metrica sigma, che in assenza di bias vale $[ETa / CV_{\text{misurato}}]$. Decresce da ottimale a critica se risulta rispettivamente >6 oppure <3 . Ciò esige limiti più ristretti e/o maggior numero (N) di controlli. In ematologia N è 3, essendo 3 i livelli dei valori decisionali clinici. Ciò premesso, sono state applicate le normalized OPSpecs Chart di Westgard per una definita Ped (probabilità di rilevare l'errore sistematico). Queste carte (www.westgard.com) mostrano l'area di confidenza per ciascuna regola, rispetto a CV e bias rispettivamente in ascissa e ordinata, entrambi espressi in percentuale dell'ETa. Per esempio la carta di $Ped = 0.90$ mostra che la regola 1 3s (limite target $+3$ deviazioni standard) è efficace a condizione che $bias = 0$; $N = 3$; rapporto $[CV / ETa] \leq 20\%$, che equivale a metrica sigma $[ETa / CV] \geq 5$. Pertanto si imposta il CQI con limiti aventi una performance nota, tenendo conto che più la regola è restrittiva, tanto maggiore è la potenza (Ped), ma anche la probabilità di falsi positivi (Pfr).

Risultati. Utilizzando le regole 1 3s oppure 1 2.5s con $N = 3$, sono stati stabiliti limiti del CQI con una $Ped \geq 90\%$ per globuli bianchi, neutrofili; mentre con una $Ped \geq 50\%$ per globuli rossi, emoglobina, ematocrito, RDW-CV, piastrine, linfociti, reticolociti. Per MCV ciò è possibile solo con $N = 6$.

Conclusioni. Con $N = 3$ controlli per i parametri fondamentali si ottiene una probabilità del 90% o almeno del 50% di scoprire un errore sistematico che comporterebbe un ETa superiore a quello desiderabile. In tutti i casi il limite del CQI idoneo è più restrittivo di quello fornito dal produttore.

Bibliografia

Westgard JO, Internal quality control: planning and implementation strategies. *Ann Clin Biochem* 2003;40:593-611.

075

DROGHE D'ABUSO TRA I PAZIENTI DEL PRONTO SOCCORSO

A. Frezzotti¹, M.D. Solenghi¹, M. d'Anzeo¹, M. Tocchini¹
¹Lab. Analisi, Ospedali Riuniti, Ancona

Scopo. La rilevazione di soggetti che afferiscono al Pronto Soccorso (PS) sotto l'effetto di droghe d'abuso ci da indicazione della situazione locale orientando nella scelta di contromisure e di interventi di prevenzione.

Materiali e metodi. Nel 2003, 2004, 2005, 2006, 2007 le richieste per la ricerca di droghe d'abuso sono state 262, 259, 325, 327, 387, spesso accompagnate dalla richiesta di benzodiazepine e alcol. La ricerca di cannabinoidi, oppiacei, cocaina e benzodiazepine è stata effettuata sulle urine e la ricerca di alcol sul sangue. E' stato calcolato il numero di maschi (M) e femmine (F) positivi per droghe e l'età media; il confronto tra M e F e negli anni è stato effettuato con il test t Student. Sono state calcolate le frequenze dei soggetti positivi per cannabinoidi, oppiacei, cocaina, e combinazioni con benzodiazepine e con alcol; i dati sono stati elaborati con il test X^2 .

Risultati. I soggetti positivi per droghe d'abuso sono stati in totale 521 (33,39%) di cui 404 M (77,54%) e 117 F (22,46%). L'età media, 30,9 anni, dei M è significativamente inferiore all'età media, 34,42 anni, delle F ($t=2,66$, $p=0,008$) e non è variata negli anni.

Il numero di soggetti positivi non ha avuto variazioni significative negli anni 2003, 2004, 2005, 2006; l'aumento è stato significativo nel 2007 rispetto al 2006 ($X^2=18,84$, $p<0,001$). 199 soggetti (38,20%) sono risultati positivi ai cannabinoidi e in 104 (52,26%) i cannabinoidi erano associati ad altre droghe. Il numero di F positive è aumentato nel 2004 rispetto al 2003 ($X^2=18,68$, $p<0,001$); negli anni successivi il rapporto M positivi e F positive è rimasto invariato. Il numero di casi positivi per le singole droghe è aumentato nel 2007: 72 rispetto a 54 del 2006 ($X^2=5,27$, $p=0,02$) così come l'associazione droghe e benzodiazepine, 22 nel 2007 e 12 nel 2006 ($X^2=4,74$, $p=0,02$).

Conclusioni. L'uso di droghe è causa crescente di richiesta di cure al PS. I dati evidenziano che l'uso di droghe è più diffuso tra i M e che i cannabinoidi sono la droga più assunta, da sola o in associazione con altre ed è aumentata l'associazione droghe-benzodiazepine

Bibliografia

Cherpetel CJ, Ye Y. Drug use and problem drinking associated with primary care and emergency room utilization in the US general population: data from the 2005 national alcohol survey.

076

QUALITA' ANALITICA E CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO ALLARGATO NEL LABORATORIO DI ENDOCRINOLOGIA

A. Giani¹, V. Mainini¹, F. Gioia¹

¹Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera, Ospedale di Circolo di Busto Arsizio (VA)

Il Controllo di Qualità Interno (CQI) allargato è una procedura per l'elaborazione complessiva dei risultati degli stessi materiali di controllo di qualità interno provenienti da laboratori diversi.

Scopo. Valutazione di un sistema di CQI allargato per i principali analiti di endocrinologia eseguiti quotidianamente presso il nostro Laboratorio.

Materiali e metodi. Sieri per CQI DicoCARE (CARE S.r.l., Genova), a due livelli di concentrazione per ogni seduta analitica: TIR1 e TIR2 per analiti tiroidei, MET1 e MET2 per metabolismo osseo, surrenalico e glucidico, FER1 e FER2 per ormoni di fertilità. Gli analiti indicati sono dosati con metodo chemiluminescente (CLIA) e con due strumenti IMMULITE 2000-MEDICAL SYSTEMS (Genova). I risultati del CQI vengono trasferiti in modo informatico ad una applicazione Web in tempo reale (DicoCARE Online). Risultati. Per ogni analita è possibile valutare sia in forma numerica tabellare che in forma grafica (curva gaussiana e istogrammi di distribuzione di frequenza) il proprio risultato rispetto a: valore di riferimento dichiarato dal produttore, valore di riferimento dinamico (inteso come la distribuzione dei risultati del CQI di tutti i Laboratori partecipanti che stanno utilizzando lo stesso lotto di materiale di controllo), numero di risultati totali, numero di laboratori partecipanti. E' anche possibile il confronto del valore di CQI di un analita con i laboratori che utilizzano il medesimo lotto di reagente. Il software, prima dell'invio del risultato, esprime un giudizio statistico sulla validità del dato rispetto ai riferimenti indicati, evidenziando i risultati anomali con una segnalazione di allarme.

Conclusioni. Nell'ambito di un progetto di miglioramento continuo della qualità analitica, il CQI allargato permette di evidenziare ed intervenire in tempo reale sull'andamento di una seduta analitica confrontando i risultati ottenuti dello stesso materiale di controllo e in alcuni casi dello stesso lotto di reattivo con altri Laboratori. A fronte di criticità varie (strumento, nuovo lotto di reattivo, nuovo lotto di materiale di controllo, calibrazione del test) il confronto immediato con realtà simili può portare ad una più completa valutazione delle variabilità analitica.

Bibliografia

SIBioC Linee guida sulla gestione dei Programmi di CQI-2006.

077

LA MAPPA DEL RISCHIO IN MEDICINA DI LABORATORIO: APPLICAZIONI AL LABORATORIO DI CITOMETRIA CLINICA E SPERIMENTALE

I. Pascucci¹, L. Del Vecchio¹, F. Avitabile², E. Botta², G. Cacace², A. Cappuccio², G. De Marco², M. Di Resta², V. Giordano², D. Mascolo², E. Maturante², L. Sacchetti¹

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

²Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

La gestione del Rischio rappresenta una problematica di notevole interesse per la Medicina di Laboratorio, per il contributo che la disciplina assicura alla prevenzione, diagnosi e terapia (ivi incluso il monitoraggio) delle malattie. Scopo del lavoro è stato identificare le procedure finalizzate alla gestione del rischio in un laboratorio ad alta complessità come quello di citometria, che, accanto alle difficoltà concettuali intrinseche, prevede la sinergia fra sviluppo tecnologico e formazione degli operatori.

È stata effettuata l'analisi del processo e, successivamente, l'integrazione con le informazioni tratte dal Diario di Bordo, dalle non conformità e dagli indicatori ha consentito di definire la mappa del rischio, nella quale sono riportate: le criticità, la probabilità che si verifichino errori, la severità degli stessi (come espressione dell'entità del danno al paziente), le modalità di rilevabilità, e le procedure in essere per tenere sotto controllo e/o risolvere l'errore. Il prodotto degli elementi descritti è stato utilizzato come parametro valutativo.

Il rischio più alto si rileva nella fase di richiesta, la cui inapproprietezza è causata da inadeguata scelta dei pannelli anticorpali per la caratterizzazione delle cellule di interesse, con conseguente sottovalutazione della popolazione patologica ed eventuale produzione di un dato falsamente negativo. Anche nella fase post-analitica, che comporta frequentemente la necessità di prestazioni citometriche additive (la cui scelta ed esecuzione spettano al personale della citometria) la sottovalutazione di alcune informazioni ricavabili dalla fase preliminare del processo diagnostico può condurre ad un falso negativo.

Nella gestione del Rischio, pertanto, devono essere considerati due punti fondamentali: (1) la comunicazione (in particolare pre-analitica) con il reparto clinico e (2) la formazione del personale finalizzata alla corretta esecuzione della fase post-analitica del processo, con particolare riferimento alle caratterizzazioni di secondo step, non espressamente richieste dal reparto clinico ma allestite dal personale del laboratorio al fine di erogare un referto corretto e definitivo.

Ministero della Salute "Risk management in Sanità. Il problema degli errori" (DM 5 marzo 2003).

078

ANALISI DEI PARAMETRI CLINICI E DI LABORATORIO IN UNA POPOLAZIONE NAPOLETANA SOTTOPOSTA A SCREENING PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI SINDROME METABOLICA

M. Di Palo², G. Barone¹, M. Conte², A. Crea¹, V. Zanfino¹, V. Celestino¹, A. Mazzella¹

¹Lab. di Patologia Clinica e Microbiologia, D.S. 47 A.S.L. Napoli 1, Napoli

²Centro AntiDiabetico, D.S. 47 A.S.L. Napoli 1, Napoli

Obiettivo. La sindrome metabolica (SM) viene attualmente definita come una "costellazione di fattori di rischio di origine metabolica, strettamente legata all'insulino-resistenza (IR)"; il suo riconoscimento suscita sempre maggiore attenzione in quanto strettamente associata allo sviluppo della malattia cardiovascolare. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare la prevalenza della SM in un campione di utenti del Laboratorio e di analizzare la correlazione di diversi fattori di rischio tra loro, quali IR, obesità viscerale, BMI.

Metodologia. Sono stati screenati 297 soggetti in abs(204 F, 93 M; 50 di età compresa tra i 20 e i 40 anni, 141 tra i 41 e i 60 e 106 soggetti di età superiore a 61 anni); di tutti è stata raccolta l'anamnesi e sono state misurate pressione arteriosa (PA), circonferenza vita (CV), IR e BMI. Inoltre sono stati dosati glicemia, insulina, colesterolo totale e HDL. Per la diagnosi di SM ci siamo riferiti ai criteri dell'IDF.

Risultati. 74 soggetti su 297 sono risultati affetti da SM (25%). 117/274 (43%) erano normopeso (BMI#M≤25, F≤24) e di questi 7 erano affetti da SM; 186/297 (62%) avevano un'obesità viscerale, presentando una CV superiore al normale (138 F con CV >80 cm e 48 M con CV >94 cm). Dei 186 soggetti, 31 avevano un BMI≤24 ed erano tutte femmine ma volendole riconsiderare secondo i vecchi parametri (CV>88 cm) solo 8 avrebbero presentato obesità viscerale. I rimanenti 155 con obesità viscerale (108 F e 48 M) erano anche in sovrappeso. Infine 80 soggetti (37M e 43F) presentavano IR > 2,5: di questi 8 erano normopeso e 72 in sovrappeso, mentre i rimanenti 217 (56 M e 161 F pari al 73%) non presentavano IR ed erano 109 normopeso e 108 sovrappeso.

Conclusioni. Da questo studio emergono dati interessanti: la prevalenza della SM nella nostra popolazione è piuttosto elevata, pari al 25% del totale dei soggetti esaminati; ben il 10% dei soggetti con BMI (M≤25 e F≤24) è affetto da SM o IR, comportandosi da un punto di vista metabolico come obesi, il 90% delle persone con IR è obesa, dimostrando ancora una volta l'importanza del sovrappeso nel determinare tale condizione, sembrerebbe che i criteri dell'IDF non siano adattabili alla nostra popolazione, almeno per la definizione di obesità viscerale.

079

DETERMINAZIONE DELLA INSULINO-RESISTENZA E DI ALCUNI PARAMETRI DI LABORATORIO (PEPTIDE C, URICEMIA, ALANINA AMMINOTRANSFERASI) IN SOGGETTI SOTTOPOSTI AD UNO SCREENING DI VALUTAZIONE DEL RISCHIO SINDROME METABOLICA: DATI PRELIMINARI

A. Mazzella¹, G. Allegretti de Lista¹, M. Di Costanzo¹, G.A. Giovannetti¹, S. Leonardi¹, R. Amalfitano¹, M. Di Palo²

¹Lab. di Patologia Clinica e Microbiologia, D.S.47 A.S.L. Napoli 1, Napoli

²Centro AntiDiabetico, D.S.47 A.S.L. Napoli 1, Napoli

Obiettivi. L'insulinoresistenza (IR) è un elemento patogenetico importante nello sviluppo del diabete di tipo 2, dell'obesità, della dislipidemia, dell'ipertensione, componenti questi della sindrome metabolica (SM). L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di correlare l'HOMA1-IR in un gruppo di individui apparentemente "sani" sottoposti ad uno screening di valutazione del rischio sindrome metabolica a parametri di laboratorio quali peptide C, uricemia e ALT al fine di identificare soggetti a rischio di sviluppare altre malattie metaboliche.

Materiali e metodi. Sono stati sottoposti a screening 297 soggetti (204 F e 93 M) di età compresa tra i 20 e >61 anni divisi per fascia di età: 50 soggetti tra i 20-40 anni, 141 tra 41-60 anni e 106 soggetti >61 anni. Dei 297 individui 74 sono risultati affetti da SM (30M e 44F. Per la valutazione della IR è stato utilizzato l'indice HOMA1-IR; per la diagnosi di SM ci siamo riferiti ai criteri dell' IDF.

Risultati. Della popolazione esaminata di 297 soggetti: 80(27%) hanno un indice HOMA- IR > 2,5;

83 (28%) hanno un dosaggio del peptide C > 4.4 ng/ml in e di questi 11.25% un HOMA1-IR > 2,5;

68 (23%) presentano un valore di uricemia superiore al valore massimo del range di riferimento e di questi il 7.5% unHOMA1-IR>2,5; 91 (30,6%) presentano un valore di ALT superiore al valore massimo del range di riferimento e di questi il 10,8% un HOMA1-IR>2,5.

Conclusioni. E' stato scelto il dosaggio dell'uricemia, in quanto fattore di rischio cardiovascolare e parametro storicamente valutato nelle precedenti classificazioni di SM. Dai nostri dati preliminari sembrerebbe che non sia un fattore frequentemente associato alla IR. Un'attenta valutazione dei risultati ottenuti mostra che tra i soggetti con HOMA1-IR > 2,5 il 45% presenta un valore di peptide C > 3,5; il 62,5 % un valore >3,0. Il parametro ALT è stato inserito come indicatore di screening per la steatosi epatica, che sappiamo essere associata all'IR ed alla SM. Un approfondimento dello studio intrapreso ci potrà dare un' indicazione maggiore sull'utilità di inserire nello screening di SM, il dosaggio delle ALT al fine di indirizzare ad una diagnostica mirata tali soggetti.

080

NEW PERSPECTIVES ON THE USE OF CYSTATIN C AS MARKER OF RENAL FUNCTION IN THE FOLLOW UP OF TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

C. Cosma¹, G. Sartore¹, F. Piarulli¹, R. Reitano¹, M. Zaninotto², M. Plebani², A. Lapolla¹

¹Departement of Medical and Surgical Sciences, University of Padua, Italy

²Departement of Laboratory Medicine, University of Padua, Italy

Background. In clinical practice, the serum creatinine level has become the most commonly used marker of renal function. However, the measurement of creatinine concentration can sometimes lead to an overestimation of GFR. Even the urinary excretion of albumin (AER) is not a sufficient predictor of risk of diabetic nephropathy. In recent years, it has been suggested that GFR can be predicted based on the serum cystatin C concentration(1), which is not influenced by gender or age. A recent meta-analysis(2) demonstrated that cystatin C is a better marker for GFR than creatinine and can optimize early detection for diabetic nephropathy. In addition, the use of cystatin C is possibly more appropriate for establishing efficacy of treatment strategies.

Aims. The purpose of this study was to investigate the potential usefulness of cystatin C as a marker of renal function and the effectiveness of an intensive educational approach on metabolic control and kidney function in the follow up of type 2 diabetic patients.

Methods. Fifty patients (21M/29F, age 63±7 years, duration of diabetes 7.7 years) were followed for two years. Creatinine(mg/dl), cystatin C(mg/dl) and AER(mg/g creatinine) were measured. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) (mL/min) was also calculated.

Results. While AER did not significantly changed after 2 years (53±115.1 vs 40±71.5), cystatin C values was significantly improved (0.98±0.27 vs 1.05±0.27, P= 0.001), such as creatinine (0.98±0.20 vs 0.86±0.19) and eGFR (68.16±14.35 vs 78.88±18.34, P=0.000). Also metabolic control was improved after 2 years (8±1.52 vs 7±0.81, P=0.004).

Conclusion. This study supports the clinical usefulness of cystatin C as a marker of renal function in the follow up of type 2 diabetic patients and in the evaluation of the efficacy of therapeutic strategy adopted for diabetic nephropathy.

Reference

1. Mussap M, Dalla Vestra M, Fioretto P, Saller A, Vargnolo M, Nosadini R, Plebani M. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients. *Kidney International* 2002;61:1453-61.
2. Tanaka A, Suemaru K, Araki H. A new approach for evaluating renal function and its practical application. *J Pharmacol Sci* 2007;105:1-5.

081

PRENATAL DIAGNOSIS OF HEMOGLOBINOPATHIES IN SICILYM. Cannata¹, G. Fiorentino¹, A. Giambona¹¹Osp. V. Cervello, U.O. Ematologia II, Lab. Diagnosi Prenatale di Talassemia, Palermo

The Prenatal diagnosis is now an effective measure to reduce the high-incidence of hemoglobinopathies in at risk population. In Sicily the thalassemia represents a public health problem: there are about 6% of β -thalassemia carriers, 0.3% of sickle cell carriers and 0.2% of other hemoglobin variants. One couple out of 256 is at risk for thalassemia and our data report 50 new cases of Cooley's disease out of a 66,000 birth-rate per year. Since 1982 our center is started with a prevention program to reduce the high-incidence of this disease in Sicily. Prenatal diagnosis as final step of hemoglobinopathy prevention program has changed the prospects of at risk couples, allowing a preventive fetal diagnosis and the opportunity to stop the pregnancy consciously if fetus is affected. The first prenatal diagnosis of thalassemia had performed on acquisition of fetal blood and the study of globin chain synthesis. The prenatal diagnosis is effected by Chorionic Villus Sampling (CVS) and DNA analysis, rarely by Cordocentesis. Department of Prenatal Diagnosis and department of Hematology II - "V.Cervello" Hospital Palermo – as Regional Reference for Hemoglobinopathies Prenatal Diagnosis and Fetal Therapy, perform early diagnosis of this genetic disease in the whole region.

At the end of 2007, 4200 prenatal diagnosis of hemoglobinopathies had been performed. Fetoscopy, Cordocentesis and Chorionic Villus Sampling (CVS) were used in 216, 970 and 3014 cases respectively; 24% of fetuses resulted affected. We had, therefore, four diagnostic errors by the study of globin chain synthesis and one by DNA analysis. Thanks to high-efficiency and to the collaboration of all thalassemia Center in Sicily we have reduced the birth-rate for thalassemia major from 51 cases per year in 1979 to 2 new cases in 2002 (at risk couples that have decided to carry ahead pregnancies after prenatal diagnosis).

Reference

Giambona A, Lo Gioco P, Marino M, Abate I, Di Marzo R, Renda M, Di Trapani F, Messina F, Siciliano S, Rigano P. The great heterogeneity of thalassemia molecular defects in Sicily. *Hum Genet* 1995;95(5):526-30.

082

INDICATORI PROGNOSTICI NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA: VALUTAZIONE DELLE SOGLIE PER ZAP-70 E IGVHF.M. Biella¹, A. Cappellani¹, C. Parma¹, F. Sciarini¹, G. Limonta¹, P. Tramacere¹, D. Perego², A. Perego³, P. Brambilla¹, P. Mocarrelli¹¹Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio Osp. di Desio (MI)²Divisione di Medicina, Osp. di Desio (MI)³Divisione di Ematologia Osp. S. Gerardo dei Tintori di Monza (MI)

Introduzione. La leucemia linfatica cronica è un disordine linfoproliferativo cronico caratterizzato da una eterogeneità di decorso clinico che rende necessaria la valutazione al momento della diagnosi di variabili cliniche e biologiche di significato prognostico. Poiché gli indicatori clinici convenzionali non consentono di prevedere all'esordio l'evoluzione della malattia è importante valutare anche marcatori biologici come l'espressione della proteina ZAP-70 e lo stato mutazionale del gene IGVH. L'espressione di ZAP-70 in più del 20% dei linfociti leucemici ed uno stato non mutato del gene IGVH con omologia di almeno il 98% sono associate ad una prognosi avversa. E' tuttora oggetto di dibattito l'individuazione dei valori soglia da utilizzare per l'interpretazione di questi due test. Lo scopo del lavoro è quello di valutare le soglie ottimali per ZAP-70 e IGVH che consentano di discriminare i casi con prognosi favorevole da quelli ad evoluzione sfavorevole. **Materiali e metodi.** Sono stati inseriti nello studio 143 pazienti con diagnosi di LLC per i quali è stata valutata la progressione della malattia in termini di necessità di ricorso alla terapia. La prestazione dei test prognostici è stata valutata mediante analisi delle curve ROC.

Risultati. Utilizzando per l'espressione di ZAP-70 il cut-off del 20% il test prognostico ha evidenziato una sensibilità (Sn) del 56% e una specificità (Sp) del 90% (VPP=81%, VPN=73%). Applicando un cut-off del 98% per la valutazione dello stato mutazionale IGVH si ottengono valori di Sn del 46% e di Sp del 90% (VPP=78%, VPN=68%). Risultati sovrapponibili si rilevano con il cut-off del 18% per ZAP-70 e del 97% per IGVH, mentre soglie più basse si dimostrano meno efficaci. Utilizzando soglie del 32% per ZAP-70 (Sn=51%, Sp=95%, VPP=89%, VPN=72%) e del 98.5% per IGVH (Sn=41%, Sp=96%, VPP=88%, VPN=62%) si ottengono i migliori risultati in termini di predittività positiva.

Conclusioni. Nella nostra popolazione l'impiego di soglie più alte rispetto a quelle descritte in letteratura migliora il valore predittivo dei test prognostici studiati. Tuttavia è necessario confermare tali risultati con una casistica più ampia.

Bibliografia

Moreno C et al. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood Reviews* 2008;22:211-9.

083

APPLICAZIONE DI REGOLE DI VALIDAZIONE DELL'ESAME EMOCROMOCITOMETRICO NEL LABORATORIO ANALISI DELL'OSPEDALE DI DESIO

A. Cappellani¹, F.M. Biella¹, F. Sciarini¹, C. Parma¹, F. Cappellini¹, G. Limonta¹, P. Brambilla¹, P. Mocarrelli¹

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

Introduzione. L'esame emocromocitometrico automatizzato rappresenta un valido supporto nella diagnostica ematologica. Nel nostro laboratorio si effettuano mediamente 500 emocromi al giorno mediante sistema XE-2100. Le anomalie qualitative e quantitative, relative alla valutazione degli elementi corpuscolati del sangue, sono segnalate dall'analizzatore attraverso allarmi specifici. I risultati vengono convalidati con un algoritmo di regole che consente di selezionare i campioni che necessitano di un ricontrollo dei valori o di una revisione microscopica dello striscio di sangue periferico. Sono state applicate le regole di validazione, adattate alle esigenze del laboratorio, suggerite dal Gruppo di Consenso Internazionale per le revisioni ematologiche allo scopo di valutarne l'impatto sull'attività del nostro laboratorio.

Materiali e metodi. Tra luglio e agosto 2007 sono stati selezionati casualmente 500 campioni analizzati in routine. Tali campioni sono stati sottoposti alle regole di validazione in studio e quindi a ricontrollo dei valori o a revisione microscopica per verificare l'efficacia del sistema.

Risultati. Sul totale dei campioni il 22,2% è stato bloccato per la violazione di almeno una regola, il 77,8% è stato validato. Verificando la reale presenza delle corrispondenti anomalie morfologiche o quantitative, i campioni correttamente od erroneamente bloccati o validati sono stati quindi classificati come veri positivi (19,8%), falsi positivi (2,4%), veri negativi (74%), falsi negativi (3,8%). La sensibilità (84%), la specificità (97%), le probabilità post-test positiva (89%) e negativa (1,2%) ottenute soddisfano ampiamente i traguardi indicati dal Gruppo di Consenso Internazionale.

Conclusioni. Rispetto agli attuali criteri di validazione, l'applicazione dell'algoritmo comporta un incremento del numero di campioni da sottoporre a revisione microscopica o a ricontrollo dei valori. Quindi è necessario proseguire lo studio individuando ulteriori regole per una gestione differenziata dei campioni patologici pur senza aumentare il numero di falsi negativi.

Bibliografia

Barnes PW et al. The International Consensus Group for Hematology Review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005;11:83-90.

084

EVALUATION OF IMMATURE PLATELET FRACTION IN PATIENTS UNDERGONE STEM CELL TRANSPLANTATION

A. Gozzini¹, R. Caporale², A. Fanelli², S. Mercurio², M. Rossetti², G. Messeri², A. Bosi¹

¹*Dipartimento di Ematologia, Università di Firenze, Firenze*

²*Laboratorio Generale, Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze*

Platelet regeneration represents an important and separate element in the engraftment process for allogeneic stem cell transplantation. The immature platelet fraction (IPF) as determined by flow cytometry is a rapid automated measure of the least mature component of the platelet population and is thought to correlate with thrombopoietic activity of the marrow. We investigated the ability and reliability of IPF to predict platelet recovery following hematopoietic progenitor cell (HPC) transplantation as engraftment picture. IPF was compared to standard parameters of hematopoietic recovery, including the immature reticulocyte fraction (IRF), an early predictor of recovery, absolute neutrophil counts (ANC) and platelets counts.

We analyzed the kinetics of IPF in twenty-two patients undergone stem cell transplantation (SCT), nine autologous and thirteen allogeneic procedures. The source of allogeneic SCT was peripheral blood cells (PBSC) (eleven pts) and cord blood units (CBT) (two pts).

Preconditioning therapy caused an immediate and rapid fall in tri-lineage hematopoiesis. Mean days to recovery for IPF was 2.4 days less than for platelet count, 3.8 days less than for ANC, and 0.8 days less than for IRF. IPF rose transiently above 5% after a mean duration of 11 days post-PBSC, 19 days post-BMT and 24 days post-CBT. This was 2, 6 and 16 days earlier than platelet engraftment. IPF is comparable to IRF as early predictor of haematopoietic engraftment following stem cell transplantation. Then, IPF could potentially be useful as a predictor of engraftment to manage transfusion therapy.

085

VALUTAZIONE DELLA CORRELAZIONE DI DUE METODI AUTOMATIZZATI PER LA CONTA PIASTRINICA SU CAMPIONI PIASTRINOPENICI

G. Di Iorio¹, R. Florindi¹¹Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Osp. Civile Spirito Santo, Pescara

Scopo obiettivo. Sono stati selezionati 50 campioni con valori di conta Plt. < 70000.

I campioni prelevati in provette con K3-EDTA (Kima) sono stati processati entro due ore dal prelievo per correlazione strumentale.

Materiali e Metodi. Il metodo Citofluorimetrico CD 61 Immuno PLT per Cell Dyn Sapphire.

E' allestito mediante l'impiego totalmente automatico di provette monouso contenenti una biglia in polistirene rivestita di anticorpi anti CD 61 (GP III a) legati a FITC. Una aliquota di campione da testare viene dispensata automaticamente dal sistema Sapphire nella provetta con il liofilo, incubata a temperatura ambiente, agitata automaticamente per 3 minuti e letta secondo due angoli di scatter (7°-90°) ed una fluorescenza a 530nm (FL1).

Nel referto vengono esplicitati sia i valori numerici di conta plt assoluta rilevata con:

- a) un'analisi di scatter bidimensionale 7°- 90°
- b) un'analisi impedenziometrica secondaria
- c) un'analisi combinata scatter bidimensionale 7°- 90° e FL1 CD 61+

sia i valori numerici di conta piastrinica assoluta relativi a Large e Small Plt intendendo queste ultime come elementi CD 61 positivi eccedenti soglie dimensionali caratteristiche delle due popolazioni.

Il metodo impedenziometrico LH 750 Beckman Coulter
Il metodo ottico Cell Dyn Sapphire con scatter bidimensionale 7°- 90°

Risultati. Alla luce dei risultati ottenuti e se pur con una migliore prestazione del metodo ottico bidimensionale, entrambi i sistemi si prestano all'impiego di screening per la classificazione della plt penia.

Discussione e conclusioni. Entrambi i metodi dimostrano un livello di correlazione accettabile con il metodo di riferimento nella gamma complessiva di valori analizzati.

In considerazione poi della tendenza alla sovrastima di entrambi i metodi la nostra esperienza ci suggerisce di aggiungere al metodo di screening e nella sola gamma di valori critici, l'impiego del metodo di riferimento CD 61 quale conta di precisione.

Bibliografia

Segal HC, Briggs C, Kunka S, Casbard A, Harrison P, Machin SJ and Murphy M. Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. British Journal of Hematology (2004).

086

PITFALLS IN ROUTINARY HbA₂ RECOGNITION IN AN ITALIAN FAMILY WITH A D OR G HEMOGLOBIN VARIANT

C. Ialongo¹, R. Colletti¹, J. Alessandroni¹, P. Ialongo¹, I. Antonozzi¹¹Dip. Medicina Sperimentale, Univ. La Sapienza, Roma

Introduction. Hemoglobin A₂ (HbA₂) is a minor Hb component that is clinically important in the diagnosis and management of both thalassemias and sickle cell disease. Various authors (1,2) have described how the presence of HbS or HbD could influence HbA₂ quantification by the HPLC method.

Aims and Objective. Our aim was to describe the procedure we adopted for both validate an elevated value of hemoglobin A₂ and identify the nature of the interference.

Methods and Materials. A family of parents and two sons (a male and female) of Caucasian race residing in Italy (Marche) was studied for HbA₂ values. Whole family was asymptomatics.

Automated HPLC: Automated cation-exchange HPLC (VariantTM Hemoglobin System Beta-Thalassemia Short Program; Bio-Rad Laboratories) was used as the routine method for HbA₂ and Hb variant. The expected values provided by the manufacturer were 2.1–3.5% for HbA₂.

Alkaline and acid hemoglobin electrophoresis: Sebia's HYDRASYS semi-automated alkaline and acid agarose gel electrophoresis system. In our case represented the second level to validate abnormal hemoglobin patterns.

The linear regression equation for HbA₂ values of anion exchange against Sebia's electrophoresis was $y = 0.337 + 0.984x$, with a correlation coefficient of $r = 0.95$.

Results and Conclusions. A strong positive bias in the HbA₂ % values from the Variant II comes in the presence of both HbS and HbD, when compared to the alkaline electrophoresis gel (1,2). In our case, the blood samples from the mother and the daughter, at retention time of 3.77 showed a peak area of 43% and 42.5% respectively, while both father and son at retention time of 3.69 showed a peak referred as HbA₂ at 3.0 and 2.85 respectively.

The combined use of the acid and basic electrophoresis of the two samples, from the mother and the daughter, suggested the presence of a variant D or G. Since the electrophoresis of globins revealed a beta-chain like mobility, we have supposed the presence of a D type variant. The exact molecular characterization is in progress.

References

1. Hb A₂ in Subjects with Hb D. Sumitra Dash Clinical Chemistry 1998;44:2381-2.
2. Kalleas C et al. Effect of HbS in the determination of HbA₂ with the Biorad Variant II analyzer. Clin Biochem 2008 Apr;41(6):445;author reply 446.

087

DEFICIT DELLA GLUCOSIO 6 FOSFATO DEIDROGENASI: UNA PATOLOGIA SEMPRE ATTUALE

C. Mazzone¹, M. Laneve¹

¹Lab. di Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero Occidentale (Mottola-TA), AUSL TA

Scopo del lavoro. Il deficit di glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PD), responsabile di una anemia emolitica (favismo), è ereditario, trasmesso da un gene parzialmente dominante localizzato sul cromosoma X (cr.X). I maschi (M), che possiedono nel loro patrimonio genetico un solo cr.X, possono avere solo un deficit completo di G6PD in quanto l'unico gene posseduto che codifica per l'enzima, può essere sano o malato. Solo le femmine (F) possono avere un deficit parziale, quando c'è nel proprio patrimonio genetico la coesistenza di un gene sano e di uno malato. I disturbi sono scatenati da farmaci, infezioni o ingestione di fave. Lo studio da noi presentato si propone di valutare il deficit di G6PD nella nostra popolazione e la distribuzione dei soggetti per sesso.

Materiali e Metodi. La determinazione quantitativa dell'enzima G6PD nel sangue, prelevato in provette con EDTA, è stata eseguita mediante metodo spettrofotometrico sull'analizzatore Synchron LXi 725 (Beckman-Coulter). I valori di riferimento della concentrazione della G6PD sono stati i seguenti: 1) > 0,85 UI/L Normale; 2) 0,10 - 0,85 UI/L Eterozigote (solo le femmine); 3) 0-0,1 UI/L Carenza Totale.

Risultati. Nel periodo compreso tra giugno 2007-giugno 2008, presso il nostro Laboratorio di Patologia Clinica, è stata condotta l'indagine su 476 pazienti (pz), ricoverati e ambulatoriali esterni; il 76% erano M così suddivisi: 340 pz normali (71%), 22 pz carenti (5%). Il restante 24% erano F così suddivise: 94 pz normali (20%), 16 pz eterozigote (3%), 4 pz carenti (1%).

Conclusioni. Sulla base dei dati ottenuti si evince che, nella nostra popolazione studiata, il 6% presenta carenza per il G6PD e il 3% è eterozigote. Il deficit dell'enzima prevale nei M con il 76% rispetto al 24% delle F; su questo dato probabilmente influisce il fatto che un maggior numero di M si è sottoposto al test per motivi concorsuali. Il nostro studio sottolinea l'importanza del Laboratorio di Patologia Clinica nell'individuare, mediante un esame di routine, i soggetti affetti da carenza parziale o totale di G6PD, contribuendo a prevenire le complicanze drammatiche come la crisi emolitica.

088

RARE COMPOUND HETEROZYGOSIS FOR PIRUVATE KINASE-LR MUTATIONS: CLINICAL CONSIDERATIONS IN A CASE ASSOCIATED TO MITRAL VALVE REGURGITATION

A. Minucci¹, B.M. Ricerca¹, T. De Michele¹, C. Zuppi¹, E. Capoluongo¹

¹Laboratory of Clinical Molecular Biology, Catholic University of Rome, Italy

Background. Pyruvate Kinase (PK) deficiency is one of the most common causes of nonspherocytic haemolytic anemia. The correlation of genotype to phenotype is a very important field of investigation to understand the effect of the mutations on the functional role of each part of the enzyme.

Methods. We report a case of a patient, compound heterozygosis for two PK-LR mutations, presenting serious complications following the cardio surgery intervention for the mitral valve replacement. His clinical history was characterized by a chronic haemolytic anemia due to PK deficiency. The PK assay was performed manually by means of a commercially available kit. The genetic analysis of PK-LR gene was performed in two steps. We examined also his two daughters.

Results. The PK activity of the patient is resulted to be 61 mU/GR (normal value: 70-200). The sequence of PK-LR gene revealed that he was compound heterozygote for two PK-LR mutations: C1456T and G1209A. PK activity of the one daughter is resulted to be in the normal range (85 mU/GR) and carrier in heterozygosis of the C1456T mutation, while the activity of other daughter is resulted to be pathological (65 mU/GR), and carrier in heterozygosis of the G1209A mutation.

Discussion. 1) The course of this case shows two different clinical phases. Before the cardio surgery intervention, the haemolytic anemia of patient was moderate, the diagnosis was made in adult age, the spleen was moderately enlarged and no transfusions had been necessary.

The mitral valve replacement changed the clinical course of the disease: the haemolytic anemia worsened and the patient became transfusion dependent. In our patient, irregularities in function of the prosthetic valve had been never found so, it can be supposed that the passage through the prosthetic valve could damage the PK deficient RBC. This observation should induce to evaluate carefully the type of prosthesis to apply in patients with congenital RBC defects.

2) The PK-LR genetic analysis in this family confirm the high frequency in Italy of the C1456T and his limited effect on the molecular properties of the enzyme. While the G1209A results to be critical as amino acid residue located in the proximity of the PEP-binding site, giving a pathological activity in the daughters also in heterozygous status, and we assumed that it had an apparently dominant transmission of PK-deficiency.

089

ANALYSIS OF RED CELL MEMBRANE PROTEINS BY CAPILLARY GEL ELECTROPHORESISL. Mosca¹, A. Mosca¹, R. Paleari¹¹CIRME, Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano

Background. Several hereditary hemolytic anemias associated with the abnormal red cell shapes, such as hereditary spherocytosis (HS) and elliptocytosis (HE) are caused by defects of red cell membrane proteins. The detection of these abnormalities is usually performed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (1), a time-consuming and lab-intensive technique. Therefore, aim of this study was to set up a method based on SDS-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE) for the separation and quantification of major erythrocyte membrane proteins.

Methods. Twenty whole blood samples in EDTA without any apparent sign of hemolysis were collected from the laboratory routine and processed within 2 days. Erythrocytes were separated from platelets and leukocytes and then subjected to a hypotonic treatment (2) in order to prepare red cell ghosts. The analyses of red cell membrane proteins were carried out with a Beckman Coulter Proteome-Lab PA800 capillary electrophoresis apparatus equipped with a diode array detector set at 220 nm. The SDS-MW Analysis Kit (Beckman Coulter Inc.), including molecular mass standard proteins, was used. The abundances of the main membrane proteins were quantified by expressing their relative concentrations respect to band 5 (actin). **Results.** Seven major erythrocyte membrane proteins were separated and identified: α - and β -spectrin, and bands 3, 4.1, 4.2, 5 and 6. The molecular weights of all these proteins were in good agreement with those reported in literature (3). Reproducibility (expressed as CV, %) of the migration times were between 0.1 % and 0.2 %. Reproducibility of the relative abundances of the main red cell membrane proteins were between 4.5 % (band 4.1/band 5) and 16.4 % (band 6/band 5).

Conclusions. The preliminary results obtained in our investigation prove that SDS-CGE may be an alternative approach to standard SDS-PAGE for the identification of red cell membrane disorders.

References

1. Hassoun H et al. *Blood Rev* 1996;10:129.
2. Bruschi M et al. *J Proteome Res* 2005 4:1304.
3. Lin C et al. *J Chromatogr B* 2000;742:411.

090

STUDIO DEI PARAMETRI RETICOLOCITARI IN UNA POPOLAZIONE ADOLESCENTER.A. Salvo¹, S. Peralta¹, G. D'Amico¹, P. Diana¹, A. Mastrone¹¹Area Chimico-Clinica, Centro Regionale Antidoping, Orbassano (TO)

La sideropenia è una condizione, spesso clinicamente silente, che può comportare conseguenze più o meno rilevanti. Mentre l'inquadramento del paziente anemico non pone alcuna difficoltà, in quanto presenta stigmate ematologiche molto specifiche (diminuzione dell'Hgb, del MCV, del ferro della fern e aumento del recettore solubile della transferrina), problemi maggiori nascono nell'identificare precocemente gli stati di carenza marziale. Negli adulti il marker più sensibile è la Fern la cui specificità può aumentare dosando il sTfR, che presenta problematiche legate alla standardizzazione del metodo. A tali marker vengono sempre più spesso affiancati i parametri reticolocitari (CHr, MCVr, CHCMr). Esistono molti studi sulla loro utilità negli adulti pochi invece sugli adolescenti. La popolazione pediatrica, avendo un maggiore turnover marziale, presenta valori dei parametri legati al ferro più bassi rispetto agli adulti anche in presenza di situazioni normali. L'adolescenza è un'età di passaggio fra l'età pediatrica e l'età adulta, per cui è possibile riscontrare adolescenti con valori ematici sia pediatrici sia simili agli adulti.

Scopo del lavoro è stato analizzare i parametri reticolocitari su 382 adolescenti suddivisi in base alla concentrazione di ferritina in due popolazioni (A: Fern < 20 ng/mL; B: Fern > 20 ng/mL). I dati ricavati dallo studio sulla popolazione A hanno rilevato la presenza di due sottopopolazioni: la I° con valori reticolocitari normali, la II° con valori inferiori ai limiti di riferimento. Si può facilmente ipotizzare che la II° comprenda soggetti con un iniziale stato ferro-carenziale. Nella popolazione B abbiamo evidenziato soggetti con valori reticolocitari inferiori alla norma. Questi soggetti, pur presentando Fern normale (per vari motivi quali processi flogistici e/o normalizzazione verso i valori degli adulti), sono da considerare molto probabilmente in uno stadio ferro-carenziale precoce. Si può concludere che i parametri reticolocitari anche negli adolescenti sono utili per evidenziare eventuali stati ferro-carenziali. È importante ricordare che i singoli valori non hanno un'utilità diagnostica ma vanno inseriti nel contesto generale degli esami eseguiti. In questo modo dal confronto nasce un migliore inquadramento nosologico.

091

COMPARISON AND ACCURACY OF DIFFERENT METHODS FOR PLATELET COUNTING IN THROMBOCYTOPENIC PATIENTS

L. Zorzino¹, M. Picozzi¹, A. Lomonaco¹, D. Radice², M.T. Sandri¹

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

²Div. di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

Background. The need for automated haematology analysers providing accurate platelet counts, particularly in thrombocytopenic patients, is increased by the intensive use of chemotherapeutic regimens and the need to optimize platelet transfusions. Recently, the combination of flow cytometric principles with impedance technology has facilitated the simultaneous detection of multiple light scatter and fluorescent parameters of platelets and cells, therefore the modern analysers can offer a variety of platelet counting methods.

Aim. The purpose of the study was to evaluate the accuracy of different platelet counting technologies of 2 haematology analysers in routine practice.

Methods. We analysed a total of 104 blood samples obtained from different patients undergoing cytotoxic chemotherapy. The inclusion criteria was a platelet count of $< 25 \times 10^9/L$. The analysers evaluated were the Sysmex XE2100 (Sysmex, Kobe, Japan) and the Abbott Cell-Dyn Sapphire (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA). The platelet counts were correlated with the immunological platelet counting CD61 ImmunoPLT™ method, used as the reference method. The difference in platelet counts between analysers was compared using linear regression.

Results. Overall correlations were excellent with R^2 values >0.94 in all comparisons. In particular, Sysmex XE2100 impedance and optical counts showed $R^2=0.949$ and $R^2=0.943$ respectively; moreover, Cell-Dyn Sapphire standard optical counts and optical count with WBC extended count were comparable ($R^2=0.974$ and $R^2=0.976$ respectively). The impedance count on the Cell-Dyn Sapphire was not reported on most samples with low platelet counts, so it was not included in the analysis.

Conclusion. The data of our study demonstrated that all the considered methods gave fairly good results. In particular, the impedance Sysmex XE2100 platelet count was slightly more accurate than XE2100 optical count for thrombocytopenic samples, perhaps because in these samples white cells fragments are included in the optical count. Moreover the two results obtained with the Cell-Dyn Sapphire were very similar and showed a slightly better correlation with the immunological method.

References

Briggs C et al. *Int Jnl Lab Hem* 2007;29:77-91.

092

VALUTAZIONE DELLA FRAZIONE IMMATURA DELLE PIASTRINE: UN NUOVO PARAMETRO NELLA GESTIONE DEI PAZIENTI TROMBOCITOPENICI

L. Zorzino¹, L. Bava¹, M. Picozzi¹, D. Gritti¹, M.T. Sandri¹

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

Introduzione. Le piastrine reticolate rappresentano un indice dell'attività trombopoietica midollare. La determinazione automatizzata in citometria a flusso della frazione immatura delle piastrine tramite il nuovo parametro IPF, potrebbe essere di utilità clinica come indice predittivo della ripresa tromboietica dopo chemioterapia mieloablattiva e/o trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Scopo. Il nostro scopo è stato quello di valutare il valore predittivo della percentuale di IPF per la ripresa della conta piastrinica e confrontare questo parametro con la frazione di reticolociti immaturi (IRF).

Metodi. Abbiamo valutato la cinetica di IPF in 13 pazienti sottoposti a reinfusione di cellule staminali periferiche e in 4 pazienti dopo chemioterapia ad alte dosi. I valori di riferimento sono stati determinati in 27 soggetti sani. L'IPF è stato misurato su XE2100 (Sysmex, Kobe, Japan) con metodo citometrico, utilizzando uno specifico colorante fluorescente per l'RNA, ed analisi tramite un software dedicato (Sysmex IPF Master).

Risultati. Il valore medio di IPF nei soggetti sani era 1.8% (range 0.5-5.4). Considerando significativo per la ripresa un valore di IPF $> 3.5\%$ o un incremento $> 10\%$ rispetto al giorno precedente, l'aumento di IPF si è verificato ad un tempo medio di 7.4 giorni post-reinfusione o trattamento (range 4-12), con un nadir della conta piastrinica ad un tempo medio di 8.5 giorni (range 6-13) e una ripresa tromboietica media dopo 10 giorni (range 8-15). I valori medi di IPF pre-trasfusione erano 5.7% (range 3.1-9.9) e post trasfusione 3.4% (range 1.9-5.2) con una variazione media del -2.3%. Confrontando l'andamento di IPF e IRF, l'IPF ha preceduto di 3 giorni il rialzo di IRF e solo l'11.8% dei pazienti ha mostrato un valore di IRF $>10\%$ lo stesso giorno in cui si è verificato il rialzo di IPF.

Conclusioni. La valutazione delle piastrine reticolate tramite il parametro IPF fornisce una rapida e precoce informazione dell'attività megacariocitica midollare e può predire precocemente la ripresa piastrinica dopo chemioterapia e/o trapianto di cellule staminali emopoietiche, precedendo l'aumento delle piastrine e di IRF di circa 3 giorni.

Bibliografia

Briggs C et al. *Trasfusion Medicine* 2006;16:101-9.

093

Hb NIGUARDA: UNA NUOVA VARIANTE DELLE CATENE BETA DELL'EMOGLOBINA ASSOCIATA A BETA TALASSEMIA, HPFH ED EMOCROMATOSIS. Granata¹, C. Sbressa¹, A. Marocchi¹, D. Leone², D. Pascotto², G. Ivaldi²¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, Patologia Clinica, A.O. Niguarda, Milano²Lab. di Genetica, Sez. Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova

Le linee-guida più recenti relative ai metodi e ai percorsi diagnostici di 1° livello per le emoglobinopatie indicano nell'HPLC il sistema analitico di elezione per il dosaggio dell' Hb A2, Hb F e per la valutazione quali-quantitativa di eventuali altre frazioni anomale dell'emoglobina (Hb), inoltre molti sistemi HPLC "dedicati" prevedono anche il monitoraggio delle componenti glicate dell'Hb; il loro crescente uso consente talvolta un riscontro casuale di varianti dell'Hb.

Il dosaggio dell'Hb A1c (Variant II A1c-Dual Program, Bio-Rad) in un soggetto italiano di 59 anni ricoverato per craniofaringioma e in terapia per diabete insipido ha permesso di osservare un andamento anomalo del tracciato cromatografico e un dosaggio relativo chiaramente sottostimato. La successiva valutazione dell'assetto Hb mediante sistemi HPLC "dedicati" (Variant II β Thal.-Dual Program e Variant II β Thal. Short, Bio-Rad) consentiva di osservare un picco denominato HbA ma eluito ad un tempo significativamente superiore. Il paziente presentava una microcitosi spiccata con discreta anemia e i test di stabilità eseguiti sono risultati normali. L'analisi molecolare mediante sequenziamento diretto dei geni globinici (ABI Prism 3700 DNA analyzer - PE BioSystems) ha evidenziato una mutazione C>A allo stato eterozigote al nucleotide +60 del gene beta globinico con produzione di una sostituzione aminoacidica Leu>Met al codone 3 mai descritta. La variante è stata denominata Hb Niguarda. Sull'altro allele era presente una mutazione non-senso al codone 39 riferibile ad una Beta Talassemia eterozigote; tale composto di difetti determinava una quota di Hb variante superiore al 93%. Successive indagini molecolari eseguite per un più completo inquadramento genotipico hanno indicato la presenza di una persistenza ereditaria di Hb F (HPFH- Agamma -225/-222 Del) allo stato eterozigote e la mutazione H63D sul gene HFE allo stato eterozigote riferibile ad una forma di emocromatosi ereditaria con iperferritinemia di grado medio (1390 ng/ml). Tale quadro complesso di determinanti genetici non avevano apparentemente mai prodotto in precedenza nel soggetto segni clinici di rilievo. Pertanto possiamo concludere che:

- questa nuova variante Hb Niguarda verosimilmente non differisce dall'Hb A nel trasporto dell'ossigeno e nella stabilità strutturale;
- una variante dei geni beta dell'Hb può presentare un fenotipo clinico normale anche quando è associata ad un difetto beta talassemico;

094

LABORATORY MEDICINE: THE WAY WE WERE. THE CASE OF HEMOGLOBINOPATHIESM.T. Muratore¹, D. Ponzini², P. Di Biagio², R. Meschini¹, R. Carrozza¹, M.P. Cappabianca², A. Amato²¹Lab. Analisi, Osp. Belcolle, Viterbo²ANMI Onlus-Centro Studi Microcitemie, Roma

The effects of globalization and mass migrations affect the daily clinical practice, and the detection of abnormal hemoglobins (Hb) has become more frequent. Our laboratory processes about 600 Hb samples/year. For each sample, alkaline pH agarose migration (SAS3-4 Alfa-Wassermann up to March 2008 and then Microgel Interlab) and HPLC (HA8160 Menarini) are performed. Therefore cooperation with the Centro Studi Microcitemie di Roma(CSMR) has started in order to properly identify the thalassemic defect by means of second-level analyses. Since 2006 we analyzed 1539 samples: 1271 (82.5%) had a normal HbA2 (1.8-3.2%); 98 (6.3%) had a HbA2 above upper limits (4.0-6.4%) out of these 3.1% showed high HbF levels (1.2-6.0%). 88 (5.7%) had borderline HbA2 (3.3-3.9%) out of these 0.45% showed high HbF levels (1.2-3.9%). 37 (2.4%) had normal HbA2 and high HbF levels (1.1-4.3%); 33 (2.1%) had HbA2 < 1.8%. 12 samples with abnormal Hb was sent to the CSMR for characterization with HPLC, alkaline acetate electrophoresis, in vitro globin synthesis, PCR-ARMS molecular analysis and automatic gene sequencing. These analyses detected: a) 1 HbH and Hb Bart's b) 3 HbD Punjab c) 1 Hb o-Arab d) 1 HbE e) 1 probable alpha mutation f) 2 beta^o39 g) 1 possibly HpFH. Furthermore, we found 1 Hb Lepore, 3 HbD and 2 HbS (in total 12 Hb variants:0.8%). The first-level analyses for diagnosis of microcytemia are blood count, ROE, Hb electrophoresis (EF) and serum iron to rule out iron deficiency anemia. As our laboratory frequently accepts samples for the determination of ROE and Hb EF, and as these exams may be incomplete, we added a comment to our lab report, as follows: we suggest to perform additional exams at a Thalassaemia Center if: a) HbA2 at lower limits, to rule out Delta Microcytemia or Delta mutation b) HbA2 > 3.2 and MCV > 83, for the possibility of subclinical alpha microcytemia c) HbA2 < 3.2, absent HbF, no mutations, in the presence of non hyposideremic microcytosis. In case of iron deficiency we suggest to correct the status before repeating Hb analysis. The association between HPLC and electrophoresis brings to a complete screening of hemoglobinopathies, and the cooperation with a second-level center increased our knowledge in daily clinical practice.

Reference

Le talassemie. Un problema medico-sociale: ieri e oggi. Ida Bianco Sivlestroni. Ist. Italiano di Medicina Sociale 1998.

095

IL LABORATORIO DI 1° LIVELLO E IL RISCONTRO DI DIFETTI ASSOCIATI DELL'EMOGLOBINA: PRIMO CASO DI Hb RANDWICK E BETA TALASSEMIA

G. Barberio¹, G. Ivaldi², S. Bigoni³, S. Carturan³, M. Taddei Masieri³, A. Ravani³

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, Osp. di Oderzo, Az. ULSS 9, Treviso

²Lab. di Genetica, Sez. Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova

³Lab. di Genetica Molecolare, U.O. Genetica Medica, A.O.U. S. Anna, Ferrara

Quando due o più difetti dei geni globinici vengono co-ereditati ne risulta quasi sempre la produzione di composti emoglobinici (Hb) che esprimono un assetto non sempre facilmente interpretabile: in questi casi il laboratorio di 1° livello, con metodi prevalentemente biochimici, può incontrare qualche difficoltà nel formulare una diagnosi sia pur presuntiva.

Significativo è il caso che qui riportiamo relativo ad una bambina di 10 anni inviata per accertamenti di laboratorio in seguito a ricorrenti anemizzazioni. In anamnesi veniva riferito un episodio emolitico in occasione di una infezione da parvovirus all'età di 5 anni. La probanda e la madre presentavano un profilo cromatografico (Variant II – Beta Thal Dual Kit, Bio-Rad) molto simile con un aumento significativo dell'Hb A2 nella prima. Una modica microcitosi era presente nella probanda mentre nella madre il profilo emocromocitometrico era normale. La conclusione del 1° livello ipotizzava la presenza di beta talassemia nella bambina e la necessità di ricercare e caratterizzare possibili ulteriori difetti. L'approccio molecolare successivo ha confermato nella probanda la presenza di una beta talassemia (beta° IVSI-1 allo stato eterozigote) e di una mutazione T>G al codone 15 sull'altro allele beta corrispondente alla rara variante denominata Hb Randwick già descritta nel 1988 in una famiglia italiana residente in Australia, tale difetto era presente anche nella madre. L'Hb Randwick è descritta come variante instabile dell'Hb in quanto "in vitro" presenta fenomeni di precipitazione con agenti ossidanti in parte da noi confermati.

Questo caso suggerisce che il laboratorio di 1° livello deve:

- osservare sempre attentamente il tracciato HPLC compreso i tempi di uscita dei picchi

- correlare sempre l'assetto emoglobinico con i valori emocromocitometrici

- risalire per quanto possibile ad una anamnesi "minima"

- poter eseguire nell'eventualità test funzionali (per la stabilità "in vitro", affinità con l'O₂)

- concludere in modo presuntivo rimandando ad ulteriori esami presso un laboratorio di 2° livello

L'Hb Randwick non è mai stata descritta in letteratura associata alla beta talassemia; il caso da noi descritto oltre a riportare una interessante combinazione di difetti potrà in futuro suggerire ulteriori considerazioni circa l'instabilità di questa rara variante dal momento che nella probanda ne viene prodotta in quantità superiore al 90%.

096

MODIFICATIONS OF RETICULOCYTES AND RETICULATED PLATELETS IN SEDENTARY HEALTHY MEN AFTER AN ACUTE EPISODE OF STRENUOUS EXERCISE

F. Cesari¹, F. Sofi¹, A. Capalbo², N. Pucci², A. Gori¹, R. Caporale³, A. Fanelli³, G. Messeri³, S. Califano², G.F. Gensini⁴, R. Abbate¹

¹Department of Medical and Surgical Critical Care, Thrombosis Centre, University of Florence, Italy

²Institute of Sports Medicine, Florence, Italy

³Central Laboratory, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence, Italy

⁴Don Carlo Gnocchi Foundation, Onlus IRCCS, Florence, Italy

Introduction. Exercise is considered a physiological stimulus for cells' release by the bone marrow. In particular, maximal exercise, carried out under hypoxic conditions, has been reported to determine reticulocytes' release, probably due to the augmented levels of erythropoietin. We aimed to investigate whether physical exercise can determine, together with reticulocytes, also the release of reticulated platelets (RP).

Methods. Haematological parameters (red blood count, white blood count, haematocrit, haemoglobin, platelets), reticulocytes, and RP were measured in 20 healthy sedentary men (median age: 34 years) by using the Sysmex XE-2100 haematology analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). Reticulocytes and RP were counted according to the measurement of scatter and RNA content was analyzed using oxazine. All subjects performed a maximal incremental graded treadmill test and blood samples were drawn before (T0), at the end (T1), and 30 minutes after the test (T2).

Results. All the haematological parameters showed a significant ($p=0.002$) increase at T1 with respect to T0, by returning similar to baseline at T2. Reticulocytes demonstrated a significant trend of increase at T1 with respect to T0 [52,650 (35,900-99,500) vs. 51,000(26,800-105,000) ret/ μ L; $p<0.05$], with a decrease in L fraction and a significant increase in H fraction [0.65(0.3-1.3) vs. 0.4(0-0.8); $p=0.01$]. At T2 these parameters showed a trend of decrease, by reaching similar values with respect to baseline.

Similar to the pattern of the reticulocytes' modifications, significant ($p=0.01$) higher levels of RP were observed at T1 with respect to T0 [9,550(7,300-24,000) vs. 8,250 (5,000-20,400) plt/ μ L]. At T2, however, RP values returned to similar values with respect to baseline.

Conclusions. In conclusion, we documented that a maximal physical exercise can induce, in healthy sedentary men, a release of reticulocytes, mainly of the H immature fraction. Furthermore, we are able to report that, similarly to the effect on reticulocytes, a strenuous exercise is able to induce also a release of immature RPs which are known to have a greater prothrombotic potential and higher levels of intracellular thromboxane A₂, so potentially contributing to the prothrombotic state after a strenuous exercise.

097

RETICULATED PLATELETS AND PLATELET REACTIVITY IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS ON ANTIPLATELET THERAPY

F. Cesari¹, R. Marcucci¹, A.M. Gori¹, R. Caporale², A. Fanelli², G. Messeri², R. Panicia¹, E. Antonucci¹, M. Salvadori³, G.F. Gensini¹, R. Abbate¹, M. Zanazzi³

¹Department of Medical and Surgical Critical Care, Thrombosis Centre, University of Florence, Italy

²Central Laboratory, Azienda Ospedaliero- Universitaria Careggi, Florence, Italy

³Unit of Nephrology, Dialysis and Transplantation, Azienda Ospedaliero- Universitaria Careggi, Florence, Italy

Introduction. Renal transplant recipients (RTRs) patients are at increased risk of cardiovascular morbidity and mortality. Scarce data are available about the platelet reactivity in RTRs patients and no data, are present about the possible role of reticulated platelets (RP).

Aim. To assess the platelet reactivity and RP in RTRs patients.

Methods. We evaluated 150 renal transplant recipients (M 98, F 52) with a median age of 50 (17-75) years [66/150 (44.0%) were on ASA 100 mg treatment] and 60 healthy blood donors, comparable for age and sex. RP were measured 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 percentage of RP highly fluorescent (H-IPF) and as the absolute number of RP (IPF#). Platelet function was assessed by optical aggregometry (PA) on platelet-rich-plasma induced by 1 mmol arachidonic acid (AA-PA) and 2 µg/ml collagen (Coll-PA).

Results. A significant difference for IPF, H-IPF and IPF# between RTRs patients and controls was observed [IPF 3.6 (0.9-15.1) vs. 2.8 (0.9-5.6) % p=0.002; H-IPF 1.0 (0.2-5.6) vs. 0.9 (0.2-2.0) p<0.05; IPF# 7300 (1700-22900) vs. 6150 (2400-12800) p<0.05]. In addition, a higher percentage of RP was found in patients not on aspirin therapy with respect to patients on aspirin [IPF: 3.9 (1.1-15.1) vs. 3.0 (0.9-7.5)% p=0.005; H-IPF 1.0 (0.3-5.6) vs. 0.8(0.2-2.0) p=0.002; IPF# 8050 (2000-22900) vs. 6750 (1700-15200) p=0.019]. A significant positive correlation between reticulated platelets and PA by collagen and arachidonic acid was observed (p<0.05). At a multiple linear regression analysis adjusted for age, gender, hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, smoking habit, aspirin and cyclosporine treatment, IPF and IPF# were significantly and positively related to collagen-PA. At multivariate logistic regression analysis, IPF and IPF# were significantly associated with renal transplantation [OR (95%CI): IPF and renal disease 1.68 (1.15-2.44) p=0.007; IPF# and renal disease 1.17 (0.99-1.37) p<0.05].

Conclusions. We documented a higher levels of RP in RTRs patients with respect to controls. Furthermore, RP were found to be independently associated with renal transplantation and with platelet reactivity.

098

DUBBI E CERTEZZE DEL LABORATORIO DI 1° LIVELLO A FRONTE DI NUOVE OSSERVAZIONI DI DIFETTI DELL'EMOGLOBINA: IL CASO DELL'Hb BENIN CITY

M.F. Musso¹, D. Leone², D. Pascotto², G. Ivaldi²

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, A.S.O. Santa Croce e Carle, Cuneo

²Lab. di Genetica, Sez. Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova

Il riscontro di varianti emoglobiniche, durante gli esami di screening per le talassemie e per gli altri difetti dell'emoglobina (Hb), è evento piuttosto raro nella popolazione italiana (frequenza media 0.1% contro 2% per la beta talassemia) con differenze significative da Nord a Sud della Penisola. In Italia oltre l'85% delle varianti Hb è costituito da Hb S, Hb D Los Angeles, Hb C, Hb Hasharon, se ne deduce che nella nostra popolazione le altre emoglobinopatie (oltre 100 tipi diversi) sono molto rare. In questi ultimi anni però con l'immigrazione, prevalentemente da aree a più elevata incidenza di emoglobinopatie, i difetti strutturali dell'Hb allo stato eterozigote e i relativi composti si osservano con maggior frequenza.

Recentemente in occasione di accertamenti per una sospetta anemia in una donna nigeriana si è osservata una variante Hb pari al 45.6% che in HPLC (Tosoh G7) si separava dall'Hb A ma era coeluita con l'Hb A2 (come l'Hb E); in elettroforesi acida ed alcalina nonché con altri sistemi cromatografici "dedicati" non si osservava la presenza di detta variante. E' sorto il dubbio che si trattasse di un artefatto e pertanto si è ritenuto di procedere ad una conferma molecolare mediante sequenziamento diretto dei geni globinici. E' così risultata presente una mutazione A>C al nucleotide 63 del gene beta che determinava una sostituzione aminoacidica Thr>Pro al codone 4, sostituzione non descritta che è stata denominata Hb Benin City dal nome della città della Nigeria dove è nata la paziente. I test per la stabilità sono risultati lievemente alterati segno di una lieve instabilità strutturale che potrebbe dipendere dall'introduzione del residuo Prolina.

Tale caso ci riconduce ad alcuni importanti concetti generali utili soprattutto per il laboratorio di 1° livello impegnato nella diagnosi di questi particolari difetti genetici:

- oltre un terzo delle possibili sostituzioni che possono dare varianti Hb sono teoricamente "silenti" in HPLC e non potranno quindi essere osservate;
- la presenza di una variante Hb può non essere sempre colta allo stesso modo da sistemi cromatografici anche molto simili e basati su principi analoghi;
- la certezza per una variante si ha solo con l'Hb S (confermata dal test di sickling);
- i dubbi e le certezze potranno trovare conforto dall'anamnesi e/o da altri parametri ematochimici noti.

099

I PARAMETRI POSIZIONALI DI COULTER LH 750 NELLA VALUTAZIONE DI PAZIENTI IN TRATTAMENTO CON OXALIPLATINO E FLUOROURACILE PER ADENOCARCINOMA DEL COLON E LORO FOLLOW UP

E. Orlandini¹, S. Lonardi², E. Bruzzi¹, I. Fabbri¹, N. Di Gaetano³, G. Gessoni¹

¹Servizio Medicina di Laboratorio, ASL14, Piove di Sacco (PD)

²Oncologia Medica 2, Istituto Oncologico Veneto IRCCS, Padova

³Instrumentation Laboratory, Milano

Scopo dello studio. La strumentazione Coulter LH750 misura per ogni campione valori medi (M) e eterogeneità (DS) di volume (V), di conduttività (C) e di scatter (S). Tali Parametri Posizionali (PP) sono stati studiati nell'esame emocromocitometrico di un gruppo di 12 pazienti in terapia con oxaliplatino e fluorouracile secondo lo schema FOLFOX-4 (André T. et al NEnglJM2004) dopo escissione di adenocarcinoma del colon (ADC). Lo scopo è verificare quali PP risultino utili per seguire l'efficacia terapeutica e per valutare precocemente gli eventuali effetti tossici.

Materiali e metodi. Abbiamo eseguito l'esame emocromocitometrico di base all'inizio del ciclo terapeutico e ogni 2 settimane per i successivi 6 mesi. I valori di riferimento dei PP su LH750 sono stati calcolati su 1355 campioni normali ottenendo valori sovrapponibili con quanto già pubblicato (Piccinini ISLH 2004). Per ciascun campione ADC è stata eseguita la valutazione microscopica su vetrino colorato con May Grunwald Giemsa. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con MedCalc.

Risultati. L'analisi statistica dei dati di Coulter LH750 ha evidenziato importanti differenze tra i campioni ACD e i normali; in particolare la media di MO# è risultata rispettivamente 0,77 e $0,54 \times 10^3$ cell/ μ L ($p=0,003$). L'analisi delle curve ROC ha inoltre evidenziato una sostanziale equivalenza dei PP ad eccezione della eterogeneità dello scatter dei monociti (MO-SSD). Questa discrimina i campioni normali dagli ACD con una AUC=0.81, un cut-off di 11,62 con sensibilità=75,7% e specificità 83%. L'eterogeneità morfologica e citoplasmatica monocitaria dei campioni di ACD risulta un fattore importante e peculiare nella valutazione di questi pazienti. La comparsa di monocitosi nel follow-up terapeutico ha indotto un'ulteriore analisi dei dati, ristretta ai campioni con MO# \geq 0.8. Questa ha ulteriormente migliorato l'efficienza del cut-off di MO-SSD a 11,64; ottenendo AUC=0.88, sens=86,7% e spec=91,3%.

Conclusioni. I dati preliminari dello studio confermano i dati clinici di ridotta tossicità di tale terapia sui granulociti. Il parametro più promettente nel follow up di tali pazienti è l'MO-SSD associato a MO#. L'eterogeneità morfologica dei monociti e del loro citoplasma correla con l'osservazione microscopica.

100

QUANTIFICATION OF JAK2617V>F MUTATION IN PATIENTS AFFECTED BY POLYCYTHEMIA VERA

F. Pallotti¹, P. Maroni³, S. Cattaneo³, C. Albeni¹, M.G. Biotti², D. Rossi³, G. De Luca¹

¹Università degli Studi dell'Insubria, Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Varese

²Lab. Analisi Chimico-cliniche, Osp. di Circolo-Fondazione Macchi, Varese

³Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Osp. di Circolo-Fondazione Macchi, Varese

JAK2617V>F somatic mutation is present in 95% of cases of polycythemia vera (PV), a myeloproliferative neoplasm. Revision of the current World Health Organization (WHO) diagnostic criteria for PV includes JAK2 mutation analysis as a major criterion for PV diagnosis (1). Being quantitative analysis of such mutation recently introduced in laboratory tests, very little is known regarding the genotype/phenotype correlation of this JAK2 mutation and clinical features in PV patients.

We quantified the amount of the JAK2 mutant allele in peripheral blood of 84 patients with PV by using a real time quantitative method provided by Nuclear Laser Medicine. This method allows the quantification of mutated allele by using standards of premixed variable percentages of mutant and wild type alleles to be compared with the amplification of both alleles in our samples. The mutated allele amount was distributed in our patients as follows: 22 patients were negative for the JAK2 mutation, in 20 patients the mutated allele amount ranged from 2 to 50%, while in 42 patients the amount of the mutated allele was higher (50-78% in 20 and 78-100% in 22). We correlated the amount of mutation with clinical and haematological features of the patients, such as white blood cells (WBC) and platelets count, at the time of the molecular analysis. In 55 of our patients, WBC count was < than 11,000/ μ L, while in 29 WBC count was >11,000/ μ L, 25 of which had the amount of mutation >50%. The result for platelet count was similar: 56 had <450,000/ μ L, while 28 had >450,000/ μ L, 20 of which had mutated allele amount >50%.

We divided our cohort of patients in two groups: a group of 42 patients with the mutation amount less than 50%, and a group of 42 patients with the mutation amount over 50%. Differences had been observed between the two groups: WBC and platelets counts were significantly higher in patients harbouring more than 50% JAK2 mutation ($p<0,0001$ for WBC; $p=0,0001$ for platelets). No differences had been observed between the two groups regarding age, time from diagnosis and hematocrit.

These results confirm the need of a more defined genotype/phenotype correlation in order to shed light on the pathogenic effect of JAK2 mutation in patient with PV.

Reference

1. Tefferi A et al. Blood 2007;110:1092-7.

101

THFs / THE IN DIFFERENT FORM OF HYPERTENSION

G. Faccini¹, O. Olivieri², F. Pizzolo², V. Ravagnani³, L. Moretti², M.G. Bonetto¹, C. Gerani¹, F. Pasini⁴, S. Friso²

¹Lab. di Analisi Chim. Cliniche ed Ematol., Policlinico Dip. Scienze Morfol. Biomed., Sez. di Chim. e Microsc. Clin., Univ. Verona

²Sez. di Medicina Interna, Dip. di Clinica e Medicina Sperimentale, Università di Verona

³Sez. di Reumatologia, Dip. di Clinica e Medicina Sperimentale, Università di Verona

⁴Dip. di Medicina e Salute Pubblica, Università di Verona

Objective and Methods. Prednisone and its active metabolite prednisolone, both substrates for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2), may represent a pharmacological challenge for the enzyme. The aim of the present work was to define the possible role of an abnormal cortisol/cortisone handling, as revealed by an urinary tetrahydrocortisol + allotetrahydrocortisol (THFs)/tetrahydrocortisone (THE) ratio from 1.5 to 3.0, by measuring urinary cortisol and cortisone metabolites in:

- i) normotensive individuals (n = 100) who received 7-8 mg/day of oral prednisone and followed-up for development of hypertension;
- ii) essential hypertensive (EH) subjects from primary care (n = 103);
- iii) EH hypertensive subjects referring to Hypertension Unit (n = 141).

For the THFs/THE assay, urine samples were analysed by gas-chromatography-mass spectrometry.

Results. About one third (14 out of 47, 30%) of glucocorticoid-treated patients who developed hypertension presented THFs / THE ratio > 1.5, whereas this feature was observed in 2.9% (n = 3) and 13.5% (n = 19) of primary and tertiary care hypertensive patients, respectively.

Having THFs / THE ratio > 1.5 was associated with a 3.8-fold increment risk of hypertension after glucocorticoid therapy, regardless of duration and intensity of prednisone therapy.

Conclusions. A number of EH patients and of glucocorticoid-treated subjects share a similar phenotype, characterized by both arterial hypertension and elevated urinary THFs / THE ratio. Such phenotype is more common in severely rather than in mildly hypertensive patients.

102

CONFRONTO TRA METODI DI ULTIMA GENERAZIONE PER IL DOSAGGIO DEGLI ANTICORPI ANTI-RECETTORE DEL TSH

A. Calloni¹, M.C. Straface¹, S. Erba¹, A.M. Girardi², E. Angelaccio¹

¹Laboratorio Analisi, Osp. di Vimercate, Vimercate, (MI)

²Laboratorio Autoimmunità-Diagnostica e Ricerca, Osp. San Raffaele, Milano

Gli anticorpi antirecettori del TSH (TRAb) sono il segno tipico della malattia di Graves.

I TRAb sono misurati con metodi che utilizzano differenti sistemi di rivelazione del segnale: radioimmunologico (RIA), chemiluminescenza (LIA), elettrochemiluminescenza (ECLIA). Scopo del lavoro è stato quello di valutare due metodi di ultima generazione: un test LIA (semiautomatico, BRAHMS) e un test immunologico ECLIA (completamente automatico, COBAS E411, ROCHE). I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con un metodo RIA (che utilizza antigene umano ricombinante) considerato il metodo di confronto accettato in letteratura. Questi i dati della imprecisione:

metodo LIA: nella serie pool basso (VM 1.09) CV 18.34%; pool alto (VM 8.56) CV 11.79%

tra le serie pool basso (VM 1.38) CV 19.56%; pool alto (VM 8.98) CV 8.79%

metodo ECLIA: nella serie pool basso (VM 2.85) CV 6.66%; pool alto (VM 6.64) CV 5.12%

tra le serie pool basso (VM 2.68) CV 10.45%; pool alto (VM 6.23) CV 4.81%

Per la correlazione tra i metodi sono stati usati 44 sieri umani di pazienti con richiesta specifica per TRAb previamente testati con metodo RIA. Le equazioni delle rette di regressione secondo Passing e Bablok sono:

ECLIA vs LIA $y = 0.14 + 1.06x$;

LIA vs RIA $y = -0.20 + 1.06x$;

ECLIA vs RIA $y = -0.14 + 1.18x$

Conclusione. Il metodo LIA ha dimostrato di essere affidabile e riproducibile per le determinazioni routinarie dei TRAb; è poco automatizzabile e con tempi lunghi di esecuzione (5-6 ore) mentre il metodo ECLIA è completamente automatico. I metodi LIA ed ECLIA mostrano una buona correlazione con il RIA: hanno buone caratteristiche per essere metodi di routine. Il metodo ECLIA della Roche, necessita di una valutazione di più lungo periodo, ma ha l'indubbio vantaggio di essere rapido con una completa automazione.

Bibliografia

1. Rees Smith B et al. A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Thyroid* 2004;14:830-7.

103

FUNCTIONAL ANALYSIS OF FOUR NOVEL CYP21A2 MUTATIONS FROM ITALIAN PATIENTS WITH 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY

P. Concolino¹, F. Vendittelli¹, E. Mello¹, A. Minucci¹, C. Carrozza¹, C. Santonocito¹, C. Zuppi¹, E. Capoluongo¹
¹Lab. Biochimica e Biologia Molecolare Clinica, Osp. A. Gemelli, Roma

Background. Steroid 21-hydroxylase deficiency is present in more than 90% of patients with congenital adrenal hyperplasia (CAH), an inherited metabolic disorder of adrenal steroidogenesis. Impaired enzymatic activity leads to the accumulation of metabolic intermediates (progesterone and 17-OHP), which results in excessive androgen production and varied signs of virilisation. Two different genes encode for the steroid 21-hydroxylase enzyme: CYP21A2 is an active gene, whereas CYP21A1P is an inactive pseudogene that contains a series of deleterious mutations. The major part of disease-causing mutations in CYP21A2 alleles are CYP21A1P-derived sequence transferred to the active gene by macro or microconversion events. Only around 5% of all disease-causing CYP21A2 alleles harbour rare mutations that do not originate from the pseudogene.

Objective. We report the characterization of four novel CYP21A2 missense mutations (p.H119R, p.I194N, p.H119R, p.I194N) found in four unrelated Italian patients with 21-hydroxylase deficiency. Three patients presented a mildest form of CAH with 17-OHP values (basal and after ACTH loading) within the heterozygotes range, while a subject was affected by a typical NC-CAH form with a basal 17-OHP value of 78 nmol/L.

Design. Functional in vitro assays for mutagenized CYP21 enzymes were performed in transiently transfected COS-1 mammalian cells. Two natural substrates, 17-OHP and progesterone, were used to test the residual enzymes activity and the apparent kinetic values.

Results. The p.D407N mutation reduced enzyme activity to 72.7% for 17-OHP and 73.6% for progesterone while the p.R224W reduced activity to 52% and 45.6%, respectively. The p.H119R mutation reduced the 21-hydroxylase activity to 31.6% for the conversion of 17-OHP to 11-deoxycortisol and to 32.5% for the conversion of progesterone to 11-deoxycorticosterone. Finally, expression of the CYP21 p.I194N mutant showed a reduction of enzymatic activity to 33.2% for 17-OHP and 46.7% for progesterone. The residual activities obtained for all mutants allow to classify them as NC-CAH mutations. These results correlate with the rate of severity of the patients' disease.

Conclusions. We report four novel CYP21A2 mutations in Italian subjects with the NC-CAH form of 21-hydroxylase deficiency. We performed the functional analysis in vitro and classified these mutations as NC-CAH variants.

104

IL MONITORAGGIO BIOLOGICO DEL PERSONALE DI LABORATORIO DI ANATOMIA PATOLOGICA

M. Filocamo¹, M. Tura¹, C. Arlotti¹, D. Casali¹, F. Peruzzi¹, S. Szymczuk¹, G. Volpones¹

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale Infermi Rimini, Italy

Nell'ambito del programma "Protezione della Salute e Sicurezza dei lavoratori contro i rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro" l'AUSL di Rimini ha messo in atto un monitoraggio biologico con l'obiettivo di verificare la potenziale esposizione a xilene degli operatori dell'U.O. Laboratorio Anatomia Patologica, addetti al turno "colorazione". Tale turno (sei ore /die) generalmente viene svolto da ogni lavoratore per una settimana ogni due mesi.

Lo xilene è un liquido incolore dal caratteristico odore aromatico la cui principale via di assorbimento in ambito professionale è quella inalatoria; viene eliminato in prevalenza con le urine e pertanto la valutazione dell'esposizione viene effettuata attraverso la misura di Acidi o-m-p-metilippurici che rappresentano il 95% della dose assorbita. Sono stati sottoposti ad indagine 9 tecnici biomedici negli anni 2005-2006-2007; i campioni urinari sono stati raccolti ad inizio turno il lunedì mattina e a fine turno venerdì pomeriggio e conservati fino al momento dell'analisi a -20°C. Per la determinazione di acido metilippurico è stata utilizzata una tecnica cromatografica con detector UV.

I risultati ottenuti indicano un'esposizione che possiamo definire assai modesta. Dei 9 tecnici 5 sono stati seguiti nei tre anni: per questi operatori si osserva una leggera diminuzione negli anni probabilmente dovuto a diradamento del turno "colorazione". Tutti i campioni presentano a fine turno un valore inferiore al limite di riferimento (1500 mg/L). In alcuni casi l'acido o-m-p metilippurico è risultato addirittura più basso di quello ad inizio turno: si può supporre l'influenza di fattori estranei all'esposizione quali alimenti, concentrazione-diluizione urinaria, tabagismo, consumo di alcool.

Bibliografia

Buratti M, Fustinoni S, Brambilla G, Colombi A. Escrezione urinaria di acidi metilippurici isomeri come indicatori biologici di esposizione ambientale a xilene. *Folia Medica* 2000;71(S2):63-8.

105

RELAZIONE TRA FUNZIONALITÀ TIROIDEA E RENALE IN UNA POPOLAZIONE DI DONNE ALLA OTTAVA SETTIMANA DI GRAVIDANZA

G. Ozzola¹, R. Nassi², C. Sommella³, F. Catania³, F. Lelli³, P. Meloni¹, G. Polverini¹

¹Sez. Lab. Analisi Casentino Dip. Patologia Clinica USL8, Arezzo

²Sez. Endocrinologia Dip. Medicina Interna USL8, Arezzo

³U.O. Ostetricia e Ginecologia Casentino Dip. Materno e Infantile USL8, Arezzo

Obiettivi. Con questo studio si vuole valutare se e quanto la funzionalità tiroidea influenza quella renale in donne alla ottava settimana di gravidanza.

Metodi. Lo studio è stato effettuato su 160 donne alla ottava settimana di gravidanza. Per la valutazione della funzionalità tiroidea si è usato il dosaggio del TSH tramite immunochemiluminescenza diretta. La funzionalità renale è stata studiata tramite la filtrazione glomerulare (GFR) calcolata con la formula MDRD (Modification of Diet in Renal Disease). Il dosaggio della creatinina è stato effettuato tramite metodo Jaffè modificato.

Risultati. La popolazione risulta avere un valore medio di TSH pari a 1.75+/-1.41 mUI/L ed un GFR di 99+/-14. I soggetti con TSH inferiore a 3.5 mUI/L hanno un GFR medio di 99+/-13; quelli con TSH compreso tra 3.5 e 5.5 mUI/L hanno un GFR di 88+/-20 e le donne con TSH maggiore di 5.5 mUI/L hanno GFR medio di 86+/-6 mUI/L. Le differenze riscontrate non hanno significatività statistica a causa della scarsità della casistica.

Conclusioni. Pur non essendoci significatività statistica i dati ottenuti sono fortemente suggestivi nell'indicare che la GFR ed i valori di TSH nelle donne in gravidanza siano tra loro in stretta correlazione. Con l'aumento della casistica e lo studio del decorso delle gravidanze sarà possibile confermare e chiarire meglio l'importanza, anche clinica, di tale correlazione.

Bibliografia

Lippi G, Montagnana M, Targher G, Salvagno GL, Guidi GC. Relationship between thyroid status and renal function in a general population of unselected outpatients. Clin Biochemistry 2008;41:625-7.

106

RUOLO DELLA RENINA DIRETTA NELLA SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO

C. Cosma¹, D. Faggian¹, G. Rocco¹, C. Fiore², D. Armanini², M. Plebani¹

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, Università di Padova

²Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Endocrinologia, Università di Padova

Introduzione. La valutazione del sistema renina angiotensina viene di solito fatta mediante l'attività reninica plasmatica (PRA) che misura la quantità di angiotensina I che si libera nel campione in esame per azione della renina endogena dopo un'ora di incubazione.

Scopo. Lo scopo di questo studio è quello di mettere a confronto i valori della PRA e della renina diretta in un gruppo di 15 persone sane e 15 affette da PCOS, una situazione clinica ove è stata documentata un'aumentata attività dell'aldosterone.

Materiali e Metodi. I criteri d'inclusione sono stati la presenza di due dei tre seguenti parametri: 1) segni clinici o biochimici di iperandrogenismo, 2) oligomenorrea e 3) ovaie policistiche. Alle pazienti è stato eseguito un prelievo venoso al 7°, 14° e 21° giorno del ciclo mestruale per valutazione di esami ormonali, PRA e renina diretta (RD). Le pazienti con PCOS sono state anche divise in base ai valori di aldosterone: gruppo 1 con valori normali (97.0-831.9) pmol/l e gruppo 2 con valori elevati.

L'analisi statistica è stata eseguita con il test di correlazione bivariata di Pearson.

Risultati. La valutazione è stata eseguita sia confrontando i parametri della renina diretta con quelli di PRA sia i rapporti aldosterone/PRA e aldosterone/RD. Si è notata una correlazione positiva tra PRA e RD sia nel gruppo di controllo ($r=0,97$, $p<0,0001$) che in quello affetto da PCOS ($r=0,98$, $p<0,0001$). Per i valori dei rapporti aldosterone/PRA e aldosterone/RD vi è sempre una buona correlazione per entrambi i gruppi dello studio (controlli: $r=0,72$, $p<0,0001$; PCOS: $r=0,82$, $p<0,0001$).

Una correlazione positiva si è evidenziata tra i valori dei rapporti aldosterone/PRA e aldosterone/RD sia per i soggetti con valori di aldosterone >1000 pmol/L ($r=0,87$, $p<0,0001$) sia per i soggetti sani ($r=0,92$, $p<0,0001$).

Conclusioni. I metodi di dosaggio della PRA e della RD presentano una buona correlazione. In base al nostro studio la valutazione della RD potrebbe essere usata di routine, considerata la semplicità di esecuzione e i costi minori. Lo studio dovrà in ogni caso essere completato con lo studio di pazienti con iperaldosteronismo primitivo.

107

RUOLO DELL'ADIPONECTINA NELLA SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO

C. Cosma¹, C. Fiore², D. Faggian¹, D. Armanini², M. Plebani¹

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, Università di Padova

²Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Endocrinologia, Università di Padova

Introduzione. L'adiponectina è una proteina sierica prodotta dal tessuto adiposo bianco. Precedenti studi hanno evidenziato come alte concentrazioni sieriche di adiponectina riescano a mantenere l'integrità endoteliale, rallentano l'aterosclerosi e proteggano dal diabete e da malattie cardiovascolari. L'obesità e gli androgeni, invece, abbassano i livelli nel siero di adiponectina.

Scopo. Valutare i livelli di adiponectina nelle diverse fasi del ciclo mestruale (al 7°, 14°, 21° giorno) in donne sane e in donne affette da sindrome dell'ovaio policistico (PCOS). Materiali e Metodi. In questo studio è stato valutato un gruppo di 30 donne, 15 affette da PCOS e 15 donne sane, appaiate per età e BMI. La diagnosi di PCOS si è fatto in base alla presenza di almeno due tra i seguenti parametri: (1) segni clinici o biochimici di iperandrogenismo, (2) oligo- o amenorrea, (3) ovaie policistiche, dopo aver escluso altre patologie che presentano le stesse caratteristiche. Tutte le pazienti sono state sottoposte ad esami biochimici ed ormonali. Le pazienti hanno aderito allo studio con il loro consenso informato. L'adiponectina è stata valutata con metodica RIA (Linco Research).

L'analisi statistica è stata eseguita con il test di correlazione bivariata di Pearson per l'associazione tra adiponectina e parametri clinici ed endocrino-metabolici, mentre per confrontare i livelli di adiponectina si è usato la t di Student per dati non appaiati

Risultati. Non si è notata una differenza significativa tra i valori medi del gruppo di controllo ed il gruppo con PCOS (30,7 ± 38,5 vs 17,20 ± 18,14 #g/ml), nei tre giorni di misurazione durante le fasi del ciclo mestruale. Non si è trovata alcuna correlazione tra l'adiponectina ed i seguenti parametri ormonali: LH, FSH, testosterone, androstenedione, insulina, progesterone, DHEA-S, prolattina e SHBG.

Conclusioni. Le donne affette da PCOS presentano valori di adiponectina più bassi rispetto al gruppo di controllo. In entrambi i gruppi non si è presentata alcuna correlazione tra l'adiponectina e il BMI avendo la popolazione del nostro studio una BMI < 24 Kg/m².

Da tale studio si evince che l'adiponectina è maggiormente correlata al BMI che alla patologia ginecologica considerata.

108

CONFIRMATION/QUANTITATION ANALYSIS BY GC/MS OF OPIATES, COCAINE AND THEIR METABOLITES IN PLASMA

M. Vidali¹, M. Bagnati¹, P. Porta¹, M. Albertario¹, D. Scarano¹, N. Atzeni¹, C. Boieri¹, M. Bertinazzi¹, G. Bellomo¹

¹Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

Nowadays, screening and confirmation tests for drugs of abuse are mainly performed on urine samples. However, illicit drug-induced alterations, as well as the application of administrative or penal sanctions, depend on drug blood concentrations. Aim of this work has been the development of a GC/MS method to confirm and quantify blood levels of illicit drugs.

1 ml of plasma, after deproteinization and solid phase extraction, is derivatized with pentafluoropropionic anhydride and pentafluoropropanol, and reconstituted with 60µl of ethyl acetate after evaporation. The analysis is performed by GC/MS technique, using an ELITE-5ms 30m 0.25mm x 0.25µm column, recording two specific ions for each molecule, according to Italian ISS guidelines. Calibrator samples were prepared by adding increasing amounts of stock solutions of pure standards. Blood samples of patients positive on a FPIA screening test on urine were analyzed.

Linearity ranges (ng/ml) and detection limits (LOD) (ng/ml) of the method were: morphine (10-1000, r₂=0.999, 2), codeine (10-1000, r₂=0.998, 2), 6-monoacetylmorphine (5-1000, r₂=0.998, 1), cocaine (5-1000, r₂=0.998, 3), benzoylecgonine (5-1000, r₂=0.998, 3). By comparing data obtained in urine and plasma, we have observed that some patients with high urine levels of different illicit drugs displayed low or even undetectable plasma concentrations. The GC/MS method developed allows to confirm and quantify the presence in plasma of the illicit drugs investigated. Higher plasma amounts or a lesser reconstitution volume lead to a further increase in test sensitivity. The large differences observed between plasma and urine concentrations emphasize that plasma and not urine should be used as the choice matrix in order to discriminate between subjects with recent drug consumption but without mood and consciousness alterations and subjects acting under illicit drug influence, where a penal instead of an administrative sanction must be imposed.

Reference

Moeller MR, Kraemer T. Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs. *Ther Drug Monit* 2002;24(2):210-21.

109

ANALYSIS OF 11-NOR-9-CARBOXY-DELTA 9-TETRAHYDROCANNABINOL IN HAIR BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

M. Brambilla¹, S. Cristoni², E. Gonella¹, P.M. Gerthoux³, M. Bertona¹, L. D'Amato¹, P. Mocarrelli¹, P. Brambilla¹

¹University Department of Laboratory Medicine, Hospital of Desio, Desio (MI)

²ISB, Ion Source and Biotechnology, Milano

³Department of Laboratory Medicine, Hospital of Sesto San Giovanni, Sesto San Giovanni (MI)

Introduction. Marijuana abuse is detectable by identifying the presence of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in hair samples. The metabolite THC-COOH is present at very low concentrations (pg/mg hair) but it excludes external contaminations.

Aim. The objective of this study was to develop a highly sensitive LC-ESI-IT-MS method in order to detect low concentrations of THC-COOH in hair extracts prepared by solid-phase extraction (SPE).

Methods. Hair samples (20-50 mg each) were provided from 70 drug addicted subjects, washed with different solvents and cut with scissors. The samples were subjected to basic hydrolysis at 100°C for 30 minutes, spiked with deuterated internal standard (THC-COOH D3) and purified and concentrated by SPE step. Negative control hair extracts were mixed with THC-COOH for a final concentration of 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50 ng/mL to obtain calibration curves. A LC-ESI-IT-MS³ method was performed with isocratic approach and positive ionization mode. To evaluate the absence of the matrix effect, 20 drug-spiked negative hair extracts were analysed.

Results. The R² of the calibration curve was in the range of 0.9987 – 0.9995 for THC-COOH. The LOD was 0.1 pg/mg hair; the LOQ was 0.2 pg/mg hair. The linearity range was 0.2 – 1000 pg/mg hair. Standards 1 and 10 ng/mg were used to evaluate the precision of the method and the coefficients of variation were respectively 11% and 12%.

Conclusions. The LC-ESI-IT-MS³ approach was capable of detecting and measuring the quantity of THC-COOH in extracts of hair samples with high sensitivity and selectivity. Because of very low concentrations of this compound the SPE step could not be avoided.

Reference

Huestis et al. Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users, *Forensic Sci Int* 2007;169(2-3):129-36.

110

DETERMINAZIONE DELLE ISOFORME DELLA TRANSFERRINA CARBOIDRATO-CARENTE MEDIANTE ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

C. Canali¹, T. Trenti¹, R. Bedin², P. Sola²

¹Lab. di Tossicologia e Diagnostica Avanzata, Nuovo Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

²Dip. di Neuroscienze-Sezione di Neurologia, Nuovo Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

Introduzione. La determinazione della transferrina carboidrato carente (CDT), per la diagnosi di abuso cronico di alcol, attualmente è eseguita con metodiche cromatografiche, elettroforetiche ed immunometriche. L'identificazione delle varianti genetiche (VG) della proteina si basa esclusivamente sul profilo elettroforetico/cromatografico. In passato l'isoelettrofocalizzazione (IEF) e' stata la metodica di elezione in numerosi studi di base, soprattutto per le valutazioni di tipo qualitativo ed è ancora considerata la metodica gold standard per la caratterizzazione e classificazione delle VG. Lo scopo dello studio è di confermare mediante IEF/IB i campioni in cui erano state precedentemente individuate VG della transferrina (Tf) in elettroforesi capillare (CZE). Tali campioni sono stati analizzati con IEF, seguita da immunofissazione, tecnica che permette di separare le isoforme della Tf in base al loro punto isoelettroico e visualizzarle mediante colorazione degli immunocomplessi.

Materiali e metodi e risultati preliminari. Lo studio ha incluso i sieri di 31 pazienti inviati al laboratorio per l'analisi di CDT e nei quali è stato riscontrato un elettroferogramma indicativo di VG. I campioni, dopo saturazione ferrica, sono stati sottoposti a IEF su gel di agarosio a gradiente di pH 5-8 (Pharmalyte GE-Healthcare). L'immunofissazione con anticorpi specifici anti-Tf (Dako) è stata rivelata mediante reazione colorimetrica con Nitro-blu tetrazolio e Bromo-cloro-indolil fosfato. Tale metodica ha consentito di tipizzare e confermare i campioni in precedenza classificati come VG mediante CZE evidenziando pattern elettroforetici diversi associati alle VG B e D.

Conclusioni. Considerata l'importanza del parametro CDT dal punto di vista medico-legale, lo studio suggerisce che la valutazione delle VG della Tf sulla base del tracciato elettroforetico non sia sufficiente. Appare quindi necessario disporre di una tecnica più specifica per confermare e classificare questi campioni per comunicare una corretta informazione ai clinici di riferimento. I nostri risultati indicano che l'IEF/IB risponde a questi requisiti.

Bibliografia

Wuyts B, Delanghe J, et al. Determination of carbohydrate-deficient transferrin using capillary zone electrophoresis. *Clin Chem* 2001;47:247-55.

111

VALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DELLE VARIANTI GENETICHE DELLA TRANSFERRINA NELLA POPOLAZIONE MODENESE

C. Canali¹, C. Rota¹, T. Trenti¹

¹Lab di Tossicologia Clinica e Diagnostica Avanzata, Nuovo Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

Introduzione. La transferrina carboidrato-carente (CDT) è considerata il marcatore più sensibile e specifico per determinare l'assunzione cronica di alcool. Esistono almeno 38 varianti genetiche (VG) della transferrina di cui tre mostrano una prevalenza >1%: Tf C, è la più comune nella popolazione caucasica con la più alta prevalenza (95%), Tf B e Tf D. A tutte queste si aggiungono le associazioni eterozigoti tra C, D e B, nonché tra le C e le B e tra le C e le D.

Le VG B e D possono interferire con la determinazione di CDT producendo, rispettivamente, valori più bassi e valori più alti ed i dati ottenuti possono essere erroneamente interpretati.

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare la prevalenza delle VG nella popolazione modenese in campioni inviati al laboratorio per l'analisi di CDT.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati 3750 campioni di siero di soggetti raccolti nel periodo giugno 2006-giugno 2008. Le analisi in CZE sono state condotte con elettrografo capillare PACE MDQ Beckman Coulter con reattivo CEofix CDT KIT (Analis, Belgium). Il cut-off di positività disialo/tetrasialo era pari a 2,5%.

Risultati. Nella nostra casistica, il numero di VG rilevato è risultato essere di 1 (0,44%) nei sei mesi del 2006, 17 (1%) nell'anno 2007 e 13 (0,71%) nei 6 mesi del 2008, per un totale di 31 (0,83%). Tali VG sono state individuate esclusivamente sulla base del profilo elettroforetico limitandosi ad indicare la loro presenza nel referto. Se questa procedura può essere utilizzata nella pratica clinica appare opportuno disporre di tecniche di conferma quando il dato fornito viene richiesto per scopi amministrativi o medico-legali.

Questo limite è stato attualmente superato attraverso la conferma dei campioni con tecnica di isoelettrofocusing.

Conclusioni. La bassa percentuale di VG rilevate rende il parametro CDT utilizzabile, senza problemi interpretativi, nella quasi totalità della popolazione. Tuttavia, in presenza di varianti, è opportuno disporre di metodologie alternative a più elevata specificità per comunicare una corretta informazione ai clinici di riferimento.

Bibliografia

Wuyts B, Delanghe J, et al. Determination of carbohydrate-deficient transferrin using capillary zone electrophoresis. Clin Chem 2001;47:247-55.

112

A NOVEL AND SENSITIVE ANALYTICAL METHOD FOR TOPIRAMATE ASSAY IN HUMAN SERUM BY GC-MS

E.V. De Nicolò¹, E. Ceci¹, A. Nitti¹

¹Ente Ecclesiastico, Ospedale Generale Regionale "F. Miulli", Acquaviva delle Fonti, Bari

A new sensitive and very simple GC-MS method for analysis of topiramate, an antiepileptic agent, in human serum is described. The assay involved organic extraction with toluene. After mixing for 60s on a vortex mixer and centrifugation, the organic phase was removed and evaporated to dryness under stream of nitrogen. The residue was redissolved and injected for analysis. A DB-5MS, fused silica capillary columns (Restek) was used, yielding typical retention time of 13.4 min for topiramate. MS acquisition was performed in SIM, by monitoring the signal of the particular fragment of topiramate. The standard curve was validated from 0.5 to 10 mg/l. The resulting chromatograms showed no endogenous interfering peaks with the respective blank human serum. Chromatograms corresponding to topiramate produced sharp peak that was well resolved. Two minor human metabolites of topiramate did not interfere with the assay. The analysis performance was carried-out in terms of specificity, sensitivity, linearity, precision, accuracy and stability and the method was shown to be accurate. This assay was successfully applied to determine the pharmacokinetics of topiramate during the development of this drug.

113

A SIMPLE CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD FOR THE ANALYSIS OF LAMOTRIGINE IN SERUMG.A. Deiana¹, D. Corda¹, M. Barrocu¹, M.G. Piluzza¹, G. Zucca¹, G. Sechi¹¹Lab. Neurochimica, Ist. di Clinica Neurologica, Univ. di Sassari, Sassari

Lamotrigine (LTG) is a new antiepileptic drug, the protein binding of which is approximately 55% at serum levels of 1-10 µg/mL. High performance liquid chromatography (HPLC) is the method of choice in therapeutic drug monitoring (TDM), requiring large amounts of organic solvent for elution and, often, sample extraction for clean-up before injection on the column.

We used a simple capillary electrophoresis (CE) approach described by Shihaby and Oles based upon deproteination with acetonitrile and injection of the acidified supernatant.

We verified the quality of this CE method by analyzing the quality control samples (QCS) UKNEQAS (Cardiff, UK) containing 6 therapeutic drugs plus LTG. A stock solutions of LTG and thyramine (THY) as internal standard (I.S.) were prepared in methanol (1 mg/ml) and stored at 5° C. Aliquots of these solutions were added to human plasma free of drugs to prepare samples calibration. Briefly, 100 µl of serum or plasma (quality control, calibrators) and 200 µl of acetonitrile containing 30 µg/ml THY were vortex mixed for about 15 s and centrifuged at 10000 g for 5 minutes. Then the clear supernatant was decanted and combined with 100 µl of 0,9 M acetic acid and an aliquot of this mixture was injected.

A MDQ capillary electrophoresis instrument with the 32 Karat Software (Beckman Coulter, USA) was used for analysis using fused-silica capillaries of 42 cm x 75 µm. We applied a voltage of 20 kV, a hydrodynamic sample injection pressure of 34.47 kPa s (5 p.s.i. s). The solute detection was performed at 210 nm. The temperature cartridge was maintained at 25°C. Before each analysis the capillary was rinsed with 0,1 M NaOH for 2 min and with running buffer for 2 min. The running buffer was composed of 130 mM sodium acetate that was adjusted with acetic acid to pH 4.5. The assay is based upon three-point internal calibration in the range of 1-10 µg/ml using relative peak areas for data evaluation.

Data obtained from QCS showed that this method compare well with those obtained by other methods (HPLC). Interferences originating from the other drugs in the QCS tested were not observed.

The CE assay for LTG is a very simple method for TDM in a routine setting.

114

OMOCISTEINA E NUOVI FARMACI ANTIEPILETTICIA. Buongiovanni³, S. Esposito¹, T. Di Matola¹, M.P. Salvi¹, L. Bilo², P. Di Nocera³¹U.O.C. Chim. Clin. Miocr., C.T.O. A.S.L. Napoli 1²D.S. Neurol., Centro Epil., Univ. Federico II di Napoli³U.O.S.D. Chim. Toss., C.T.O. A.S.L. Napoli 1

L'obiettivo della presente ricerca è quello di verificare se e quanto il trattamento terapeutico, della durata non inferiore ad un anno, con farmaci anticonvulsivanti quali oxcarbazepina oxcbz, levetiracetam lvt, lamotrigina lmg, topiramato tpr, influenzi la concentrazione plasmatica della omocisteina (Hcy), della vitamina B12 e dei folati. Sono stati analizzati 316 campioni di pazienti sia di sesso maschile sia di sesso femminile, in costante trattamento farmacologico solo con i predetti farmaci e precisamente 122 in mono e 194 in politerapia. Le analisi chimiche effettuate con tecniche cromatografiche, HPLC/DDA/FD e GC/NPD, hanno indicato così come descritto dai seguenti risultati, un netto aumento della Hcy tra il 17 ed il 30% secondo la successione tpr < lvt < lmg < oxcbz. Le conclusioni sono a favore di un costante monitoraggio della Hcy, dei folati e della vitamina B12, i cui dati ottenuti mostrano come un prolungato trattamento con detti farmaci generi uno squilibrio vitaminico che va ristabilito non riducendo l'apporto terapeutico, rischiando di aggravare le condizioni patologiche, ma intervenendo con un supporto vitaminico atto a riportare la conc. della Hcy nel range fisiologico.

Distribuzione per età e sesso

Età (anni): 35±21

Peso medio (Kg): 64±17

Maschi/Femmine (%): 55/45

Monoterapia/Politerapia

Numero di pazienti: 24/32 (tpr); 36/70 (lvt); 22/34 (lmg); 40/58 (oxcbz)

Posologia media mg/Kg/die: 7,5±1,9 (tpr); 33,8±8,9 (lvt); 5,5±1,9 (lmg); 22,7±5,3 (oxcbz)

Concentr. sierica media µg/mL: 4,0±2,7 (tpr); 21,7±8,1 (lvt); 4,2±2,4 (lmg); 14,5±5,3 (oxcbz)

Omocisteina % > 15 µmol/L: 17,1 (tpr); 21,6 (lvt); 27,2 (lmg); 30,7 (oxcbz)

Vitamina B12 % < 145 pmol/L: 33,3 (tpr); 37,5 (lvt); 29,2 (lmg); 62,5 (oxcbz)

Folati % < 7,0 nmol/L: 8,1 (tpr); 0,0 (lvt); 8,3 (lmg); 0,0 (oxcbz)

Bibliografia

1. Pisani F et al. Omocisteina ed epilessia. Neurol Sc 2006;27:XXXVII Congr. SIN

2. Sener U et al. Effects of common anti-epileptic drug monotherapy on serum levels of homocysteine, vitamin nB12, folic acid and vitamin B6. Seizure, 2006 Mar;15(2):79-85, Epub 2006 Jan 18.

115

CONFRONTO DI DUE METODI PER IL DOSAGGIO DELLA BUPRENORFINA

M. Filocamo¹, M. Tura¹, C. Arlotti¹, D. Casali¹, F. Peruzzi¹, S. Szymczuk¹, D. Vasi¹, G. Volpones¹

¹Servizio di Medicina di Laboratorio Ospedale Infermi Rimini, Italy

La Buprenorfina è una molecola impiegata nei programmi di assuefazione da Oppiacei; il dosaggio nelle urine è utilizzato per controllare la compliance del soggetto in trattamento sostitutivo e per individuare l'uso improprio del farmaco. Obiettivo del nostro lavoro è confrontare il kit Buprenorfina Immunoanalysis distribuito da Siemens (HEIA) con il metodo CEDIA, EIA che si avvale della tecnologia del DNA ricombinante, prodotto da Microgenics, in uso presso il nostro laboratorio sull'analizzatore VIVA-E della Siemens. Per entrambi i metodi è stata utilizzata una curva di calibrazione (analisi semiquantitativa) e i risultati sono espressi in termini di assenza o presenza usando come livello decisionale (cut off) 5 ng/ml. Sono stati analizzati 98 campioni urinari di pazienti in terapia con Buprenorfina a vario dosaggio (da 2 a 20 mg/die), provenienti da Ser.T, Pronto Soccorso, Commissione Medico Locale Patente di Guida. Tutti i campioni positivi sono stati confermati col sistema cromatografico multicolonna (Remedi HS) che può evidenziare la Nor-Buprenorfina mediante analisi diretta o dopo idrolisi enzimatica del campione usando la betaglucuronidasi arilsolfatasi. Le prestazioni analitiche, in termini di precisione globale, sono state valutate con due sieri di controllo contenenti rispettivamente 3.75 e 6.25 ng/ml di buprenorfina, e per ognuno sono state eseguite 20 determinazioni; i relativi CV % sono pienamente accettabili e in linea con i valori abitualmente ottenuti con il metodo in uso presso il nostro laboratorio. Abbiamo riscontrato una buona sovrapposibilità dei risultati: in 82 campioni la buprenorfina risulta presente e assente in 11 con entrambi i metodi. I casi discordanti sono 4: in tali campioni la buprenorfina era presente/borderline per il metodo CEDIA e assente con il kit Buprenorfina Immunoanalysis e la successiva analisi cromatografica ha riscontrato l'assenza di buprenorfina e del suo metabolita. Dai nostri dati si evince che la performance del metodo in valutazione è comparabile dal punto di vista della risposta analitica con quello in uso.

Bibliografia

Filocamo M, Castellana N, Tura M, Arlotti C, Casali D, Peruzzi F, et al. Valutazione dei sistemi di dosaggio dei metaboliti della Buprenorfina. *Biochim Clin* 2004;28.

116

MONITORAGGIO DI UN PAZIENTE CON INTOSSICAZIONE ACUTA DI GLICOLE ETILENICO

M.A. Mangano¹, A. Signorelli¹, C. Corsaro¹, C. Bellocchi¹, I. Zinno¹

¹U. O. Chimica e Clinica Tossicologica, Lab. di Sanità Pubblica, Az. U.S.L. 3, Catania

Il Glicole Etilenico (GE) è il componente principale dei liquidi antigelo. Per il suo sapore dolce può essere ingerito accidentalmente dai bambini, volontariamente dagli alcolisti in sostituzione dell'alcool o a scopo suicida. Il GE è rapidamente assorbito nel tratto gastrointestinale e metabolizzato a livello epatico con formazione di acidi tossici, che, nei casi di intossicazione acuta, provocano inizialmente ebbrezza e lieve gastrite per evolvere poi, se non tempestivamente trattati, in acidosi metabolica, insufficienza renale e morte. Il caso clinico presentato in questo lavoro ha permesso di valutare l'efficacia della terapia utilizzata mediante il monitoraggio sia dei livelli ematici di GE sia dell'alcool etilico utilizzato come antidoto.

I campioni di siero sono stati analizzati con metodo gascromatografico a spazio di testa.

Nell'arco di 4 giorni sono stati analizzati 7 campioni: nei primi 2 giorni, a seguito del trattamento combinato dialisi-etanolo, sui 4 campioni analizzati è stato riscontrato un decremento della concentrazione di GE di circa il 5% l'ora; il 3° giorno, con la sospensione del trattamento dialitico, nonostante il mantenimento della terapia con etanolo, si è verificato un rialzo dei livelli ematici di GE.

Da quanto esposto, risulta evidente come il monitoraggio di GE abbia consentito sia di confermare l'iniziale sospetto clinico, sia di valutare l'efficacia della terapia utilizzata.

117

LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR ETHYLGLUCURONIDE AND ETHYLSULFATE IN MECONIUM: NEW BIOMARKERS OF GESTATIONAL ETHANOL EXPOSURE?

E. Marchei¹, M. Pellegrini¹, A. Groppi², C. Stramesi², F. Vagnarelli³, M.C. Rotolo¹, S. Pichini¹, L. Morini²

¹Department of Drug Research and Medicine Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy

²Department of Legal Medicine and Public Health, University of Pavia, Pavia, Italy

³Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy

Introduction. Fatty acid ethyl esters (FAEEs) in meconium were found as reliable, direct biological markers for establishing gestational alcohol exposure. Conversely, ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulfate (EtS), two ethanol metabolites already detected in blood, urine and hair have been never investigated in this neonatal biological matrix. We developed a sensitive and specific LC-MS/MS method for the determination of EtG and EtS in meconium.

Methods. The analytes were extracted from the matrix by acetonitrile, concentrated by solid phase extraction, separated and quantified by a reversed-phase chromatographic column using a mixture of 0.1% formic acid and acetonitrile (99:1, v/v). Flow rate was set at 0.2 ml/min. Detection was performed with a triple-quadrupole mass spectrometer that monitored two specific transitions per compound (m/z 221 # 75 and 221 # 85 for EtG, m/z 125 # 97, 125 # 80 for EtS and m/z 226 # 75 and 226 # 85 for pentadeuterated-EtG) in the electrospray negative ionization, enhanced by post-column addition of acetonitrile.

Results. Lower Limits of Quantification (LLOQs) were 5 and 1 ng/g meconium for EtG and EtS, respectively. Calibration curves were linear from LLOQs to 500 ng/g with a minimum $r^2 > 0.99$. At three concentrations spanning the linear dynamic range of the assay, mean recoveries ranged between 78.7 and 96.8% for EtG and between 72.1 and 95.6% for EtS. Accuracy was better than 8.1%, with intra-assay and interassay imprecision better than 7.2 and 10.5%, respectively. The method was used to assess the presence of these alcohol biomarkers in meconium samples from two different city cohorts. Values of EtG in meconium samples from Reggio Emilia ranged between 5.0 and 796.2 ng/g, while those in samples from Barcelona varied between 5.0 and 6309.3 ng/g. EtS values were one order of magnitude lower than those of EtG, going from LLOQ to 13.1 ng/g in Reggio Emilia meconium specimens and from LLOQ to 437.5 ng/g in Barcelona ones.

Conclusion. These data, which for the first time evidenced the presence of EtG and EtS in meconium has been useful to plan further investigations to verify the use of these two ethanol metabolites as alternative biomarkers of chronic in utero exposure to alcohol.

Reference

Halter CC et al. Int J Legal Med 2008;122:123-8.

118

DETERMINAZIONE DI ETIL-GLUCURONIDE IN GRUPPI SELEZIONATI DI SOGGETTI: PROPOSTA DI CUT-OFF IN RAGIONE DEI RISULTATI OTTENUTI

L. Marchioro¹, A. Trombin¹, S. Toffolon¹, P. Angeli², G. Miolo³, M. Plebani¹

¹Servizio Medicina di Laboratorio, Az. Osp. Padova

²Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Az. Osp. Padova

³Dip. Scienze Farmaceutiche, Univ. di Padova

Per Etil-Glucuronide (EtG) è recentemente disponibile un immunodosaggio enzimatico (DRI-EtG EIA, Microgenics Corp.) su campioni di urina. Per alcuni gruppi selezionati di soggetti, abbiamo voluto verificare l'utilità diagnostica della determinazione di EtG, avanzando alcune riflessioni relativamente al cut-off d'uso, in attesa di un comune consenso da parte delle società scientifiche(1). Sono stati selezionati: Alcolisti Anonimi (n=14), Controllo patenti (n= 28 per 7 soggetti), Pazienti in protocollo pre e post trapianto di fegato (n=35), Tossicodipendenti (positivi alle sostanze d'abuso, n=52; negativi alle sostanze d'abuso ed etanolo, n=20), Gruppo di controllo (n= 31, 10 maschi e 21 femmine). Nei campioni di urina sono stati determinati Etanolo e EtG.

I risultati ($\bar{x} \pm ds$, range) sono stati (se non diversamente descritto le alcolurie sono risultate negative): Alcolisti Anonimi: 69.4 ± 79.4 ng/mL (0.0-255.9 ng/mL) ad esclusione di un soggetto di sesso femminile non collaborativo il cui esito di Etg è stato > 50.000 ng/mL con Alcoluria 3.22 g/L. Controllo patenti: 20.9 ± 33.6 ng/mL (0.0-119.9 ng/mL). Follow-up trapianto di fegato: 55.6 ± 71.0 ng/mL (0.0-264.9 ng/mL). Ulteriori quattro soggetti hanno però dimostrato EtG $> a 5.000$ ng/mL con un singolo riscontro di Alcoluria positiva: 1.40 g/L. Tossicodipendenti: 7527.8 ± 14730.9 ng/mL (46.0-68928.0 ng/mL) con Alcoluria: 0.37 ± 0.36 g/L, 0.11-1.33 g/L. Tossicodipendenti (negativi): 9622.2 ± 17243.5 ng/mL (14.1-56273.1 ng/mL). Gruppo di Controllo: Maschi: 9791.5 ± 16043.2 ng/mL (44.3-45854.3 ng/mL) e Femmine: 211.2 ± 420.4 ng/mL (0.0-1123.8 ng/mL).

Per Alcolisti Anonimi, Controllo Patenti, Follow-up trapianto di fegato, ci sembra clinicamente utile l'impiego di un cut-off di 500 ng/mL (1). Difficile appare l'interpretazione dei risultati di EtG per i Tossicodipendenti ed il Gruppo di Controllo. Nei Tossicodipendenti la determinazione di EtG sarebbe utile per gli abusatori cronici e non di cocaina. Nel gruppo di controllo, una differenza emerge tra il sesso femminile e quello maschile, specchio di un reale diverso comportamento o approccio all'alcol.

Bibliografia

1. Bottcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of a new immunoassay for urinary Ethyl Glucuronide testing. Alcohol & Alcoholism 2008;43(1):46-8.

119

SEPARATION OF FOUR AED'S BY A SIMPLE CHROMATOGRAPHIC METHODA. Martini¹, M. Giani¹, G. Di Ruvo¹¹U.O. Laboratorio Analisi, A.O. "Ospedale Civile di Legnano", Legnano (MI)

Introduction. The management of epilepsy has greatly benefited from the use of reliable and reproducible AED's assays (1). Of these, HPLC has the potential for simultaneous measurements of most AED's routinely administered together.

In this paper, we describe an HPLC method for the simultaneous determination of lamotrigine (LTG), ethosuximide (ETS), primidone (PRI) and felbamate (FBM) that is easy to perform, rapid and of sufficient precision for clinical applications.

Materials: Standard stock solutions of four AED's (1 mg/mL) and internal standard (p-HPPH, 1 mg/mL) was prepared in methanol. Two calibrator solutions was prepared by adding an appropriate volume of stock solution to drug-free plasma. Working solution of p-HPPH was obtained by diluting stock solution to a final concentration of 50 mg/L. Lyphochek TDM Level 1 and Level 2 (from Bio-Rad) was used as control materials.

Method. Briefly, 200 µL of serum sample (controls a/o calibrators) and 50 µL of 5-HPPH was extracted with 1,5 mL of diethyl ether in a screw-cap glass tube. After mixing for 60 sec. on Vortex and subsequent centrifugation at 1500g for 10 min, the organic layer was transferred to another conic glass tube and allowed to dryness under a gentle stream of N₂. The residue was redissolved in 200 µL of mobile phase and 20 µL was injected into the LC. Separation is performed by a Genesis C18 4µ column (150x4.6 mm) using a mobile phase consisting of methanol (27%)/phosphate buffer 0.04M pH 6.8 (73%) at flow rate of 1,2 mL/min.

Result. Separation of the four AED's was acquired before 30 min, with FBM as last peak at 23 min. None interfering peak was observed using different pools of drug-free plasma. Reproducibility within-run and between-run was done by analyzing five replicate of control materials Lyphochek TDM Level 1 and Level 2, for subsequent ten days. For FBM, the reproducibility was calculated analyzing two calibrators at concentration of 10 (level 1) and 50 mg/L (level 2) (five replicates for ten days). The intrassay precision (C.V.%) ranged from 4.4% to 7.6% at level 1 and from 3.2% to 5.8% at level 2. The inter-assay precision was found to vary from 3.8% to 6.8% (level 1) and from 2.9% to 6.0% (level 2)

Conclusion. A simple, robust and precise method for the simultaneous determination of ETS, PRI, LTG and FBM is described. The method is suitable for clinical routine TDM purposes and for pharmacokinetics study.

Reference

1. Yukawa E. Clin Pharmacokinetic 1996;31:120-30.

120

VALUTAZIONE DEL METODO IMMUNOMETRICO QMS® THERMO SU DIMENSION RXL PER IL DOSAGGIO DELLA LAMOTRIGINA NEL SIEROA. Michahelles¹, S. Gabrielli¹, A. Bandinelli¹, R. Ciuti¹¹Lab. Generale, A.O.U. Careggi, Firenze

La Lamotrigina (LTG) è un farmaco anticonvulsivante sempre più impiegato nella terapia delle epilessie. Finora il suo dosaggio su siero era possibile solo utilizzando tecniche cromatografiche in laboratori dotati di strumentazione HPLC. Recentemente la Seradyn, Thermo Fisher Scientific, distribuita da Tema Ricerca (Bo), ha proposto un kit immunometrico con microparticelle costituito da doppio reagente in fase liquida, pronto all'uso, adattabile ad analizzatori automatici. Abbiamo adattato la metodica sullo strumento Dimension RxL e paragonato i risultati con sieri testati parallelamente in HPLC-Agilent1100, kit Biorad.

Materiali e metodi. abbiamo testato 30 campioni di siero di pazienti ambulatoriali di Neuropsichiatria Infantile di Careggi; 10 in monoterapia con Lamictal, 20 in politerapia. Abbiamo valutato se vi fossero differenze tra i valori di LTG in HPLC e quelli riscontrati col metodo immunometrico tra i soggetti in politerapia e quelli in monoterapia poichè il metodo automatizzato ha discresca (71%) crossreattività per il maggior metabolita del farmaco: l'N-2Glucoronide, farmacologicamente inattivo. E' noto che farmaci come Carbamazepina (CBZ) e Fenobarbital (Pb) sono induttori di glucuronazione mentre l'Acido Valproico (VPA) ne è un inibitore. La metodica ottimizzata su Dimension RxL: vol camp= 4 µl, reag 1 e 2 =175µl. Lettura fotometrica λ=700nm dopo 440 sec. I calibratori di LTG usati: 0,2,5,10,20mg/l; valori superiori al cal più alto vengono automaticamente diluiti 1:1 per ottenere una linearità ~40 mg/l.

Risultati. Imprecisione ottenuta CV=6.41% per LTG=2mg/l e CV=4.34% per LTG=15mg/l; correlazione r²=0.82; pazienti in monoterapia: LTG(HPLC) = 4.76±1.79mg/l LTG(QMS) = 5.26±.14mg/l; politerapia con farmaci induttori (CBZ,Pb) LTG(HPLC)=6.28±2.64 LTG(QMS)=10.76±.17; politerapia con VPA LTG(HPLC)=10.35±2.55 LTG(QMS)=10.23±1.13.

Conclusioni. Il metodo immunometrico proposto presenta indubbi vantaggi per la sua semplicità d'uso e la adattabilità su qualsiasi analizzatore. Bisogna considerare però che si riscontrano valori più elevati su sieri di pazienti in terapia con farmaci induttori della metabolizzazione per il contributo non farmacologicamente attivo dell'N-2 Glucoronide.

Bibliografia

Bartoli A et al. Ther Drug Monit 1997;19:252-260.

121

ANTI-APOPTOTIC EFFECTS OF PHARMACOLOGICAL DOSES OF MELATONIN IN UV-B EXPOSED U937 CELLS

B. Canonico¹, F. Luchetti², L. Biagiarelli², M. Arcangeletti², L. Bucci², L. Zama², S. Papa¹

¹Centro di Citometria e Citomorfologia, Dip. Scienze dell'Uomo, dell'Ambiente e della Natura, Università degli Studi di Urbino Carlo Bo

²Dip. Scienze dell'Uomo, dell'Ambiente e della Natura, Università degli Studi di Urbino Carlo Bo

Melatonin, originally characterized as a molecule produced and secreted by the pineal gland, acts as antioxidant and is a potent and efficient free radical scavenger. The melatonin's ability to reduce oxidative stress is probably due to the stimulation of intracellular antioxidant components, reducing electron leakage from the mitochondrial electron transport chain, limit inflammatory processes. Cellular exposure to ultraviolet-B (UV-B) leads to ROS formation, expression of several genes involved in cell cycle arrest, DNA repair, and/or apoptosis. The response to ionizing radiation leads to cell death by pathway intrinsic, where the mitochondria appear to be the primary target (1).

In the present work, we have investigated the effects of 1mM melatonin on apoptotic pathway and mitochondria behaviour in UV-B irradiated U937 cells after 2h and 4h exposure. Flow cytometric analyses were performed to detect apoptotic/necrotic cells (annexin V/propidium iodide test) (ANX-V/PI), ROS detection (Dihydroethidium 1,5 µM), caspase-dependent apoptosis (CaspGLOW™ StainingKit) and mitochondrial membrane potential (JC1 2 µg/ml). Bcl-2 intracellular detection was performed using Cytotfix/Cytoperm kit and immunofluorescence direct labeling.

In our model, 1mM melatonin administration significantly reduced the number of UV-B induced apoptotic cells, as revealed by ANX-V/PI assay ($P < 0.05$). ROS level investigation highlights melatonin's ability to reduce radical formation (about 20%) induced by UV-B exposure. Data on caspases activation confirm the pro-apoptotic function of UV-B and the protective effect of melatonin (about 40%) in perfect agreement with ANX-V/PI data. Mitochondrial structure and function were also preserved (about 40% of protection), as demonstrated by JC-1 staining. At 2h of incubation time, bcl-2 expression in UV-B exposed samples was reduced of 43% in respect to control cells, whereas melatonin administration decreases such value to 24% ($p < 0,05$).

In summary, our studies demonstrate that 1mM melatonin protects U937 cells from apoptosis and provides a survival signal, reducing percentage of caspase positive cells, preventing ROS formation, acting on bcl-2 expression and preserving mitochondrial function.

Reference

1. Yan QL et al. Biol Pharm Bull 2006;29:1873.

122

STRATEGIE ANALITICHE PER LA CARATTERIZZAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DI FARMACI ILLEGALI DI ORIGINE ASIATICA

M. Pellegrini¹, E. Marchei¹, R. Di Giovannandrea¹, M.C. Rotolo¹, R. Pacifici¹, P. Zuccaro¹, S. Pichini¹

¹Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità

Introduzione. Il commercio di prodotti farmaceutici d'origine orientale, illegali secondo le norme della Comunità Europea, sta destando l'interesse degli esperti del settore a causa di un loro possibile rischio per la salute pubblica. Questo studio descrive le strategie analitiche utilizzate nel Dipartimento del Farmaco dell'Istituto Superiore di sanità per la caratterizzazione quali-quantitativa dei principi attivi ed eventuali contaminanti contenuti in prodotti medicinali d'origine cinese sequestrati dalle forze dell'ordine nell'anno 2008.

Materiali e Metodi. La strategia analitica adottata dal nostro laboratorio, è stata la seguente: su tutti prodotti farmaceutici d'origine cinese (es. Compound Reserpine Tablets, Quike capsule, Norfloxacin capsule, Amoxicillin capsules) gli estratti ai tre diversi pH vengono analizzati mediante cromatografia liquida (LC) e/o cromatografia gassosa (GC) accoppiata alla spettrometria di massa (MS). In base ai risultati ottenuti si provvede successivamente ad eseguire un'indagine mirata di tipo quantitativo utilizzando la GC/MS e/o la LC/MS per verificare la corrispondenza tra etichetta e risultati analitici.

Risultati. Nel prodotto "Compound Reserpine Tablets" è stata rilevata la presenza di Prometazina, Reserpina, Idroclorotiazide e Fenotiazina. sostanza non dichiarata in etichette Nel prodotto "Quike capsule" è stata rilevata la presenza di caffeina, clorfeniramina, paracetamolo e amantadina; tale associazione non è presente in alcun preparato farmaceutico in Italia. Nel Norfloxacin capsules è stata rilevata la presenza di Norfloxacin, ad un dosaggio circa 200 volte inferiore mentre nel prodotto Amoxicillin capsules è stata rilevata la presenza di amoxicillina.

Conclusioni. Tutti i principi attivi contenuti nei prodotti analizzati sono presenti anche in farmaci commercializzati in Italia che sono tuttavia dispensabili solo dietro presentazione di ricetta medica. In molti casi l'associazione tra i farmaci non ha alcuna razionalità farmacologica; ciò comporta il rischio che l'assunzione di tali farmaci possa arrecare danni alla salute. Inoltre poiché in alcuni casi i principi attivi presentano dosaggi molto bassi è improbabile che vi sia l'effetto terapeutico dichiarato.

Bibliografia

Jung J et al. Forensic Sci Int 2006;161:221.

123

ORALVEQ: EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEME OF DRUGS OF ABUSE IN ORAL FLUID. RESULTS OBTAINED IN THE FIRST ROUND PERFORMED IN 2007

S. Pichini¹, M. Ventura³, R. Ventura², S. Leal², I. Palmi¹, P. Zuccaro¹, R. Pacifici¹, R. De La Torre²

¹*Drug Control and Evaluation Department, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

²*Unitat de Recerca en Farmacologia, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain*

³*UDIMAS, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*

Introduction. The Pharmacology Research Unit of IMIM-Hospital del Mar (Barcelona, Spain) and the Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation of Istituto Superiore di Sanità (Rome, Italy) organized an external quality assessment scheme (ORALVEQ) to know the quality and the methodological approach applied by laboratories when analysing drugs of abuse in oral fluid. The first round of ORALVEQ was performed in February 2006. **Methods.** Three different samples (S1, S2 and S3) were sent to 21 laboratories. S1 was a blank sample and S2 and S3 were prepared by addition of known concentrations of drugs (S2: 6-monoacetyl morphine, morphine, cocaine, benzoyllecgonine; S3: 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine) to pre-screened drug-free oral fluid. Three reference laboratories verified spiked samples before sending them to the participating laboratories. The qualitative evaluation of results was done calculating false negative (FN) and false positive (FP) findings, while the quantitative evaluation was performed calculating the z-score values using the robust mean and the robust standard deviation of all participating laboratories. Dispersion (CV%) and accuracy (ERR%) of results were also measured.

Results. Only half of laboratories performed screening analysis. Concerning identification/quantification, all laboratories reported a quantitative result for almost all analytes and between 50% and 74% of laboratories (depending on the analyte) applied the SAMHSA recommended cut-off concentrations. GC-MS was the analytical technique most used. Regarding the qualitative results, no FN and 10 FP were reported by 2 laboratories in the screening analysis. In the identification, 8 FP were reported by 3 of the 21 laboratories. Concerning quantitative results, ERR % were around 10% and CVs% were around 40% for all the analytes. In terms of z-score, high percentage of satisfying results (~90%) were obtained.

Conclusion. Results obtained showed a global satisfactory performance of laboratories. The number of FN reported was very low and the FP were reported by a reduced number of laboratories and could be related to the interference of the resulting oral fluid to one of the immunoassay used.

Reference

Ventura M et al. *Ther Drug Monit* 2007;29:662-5.

124

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI PROPOFOL

P. Pigni¹, A. Calcinari¹, A.M. Margarucci Gambini¹, S. Marinelli¹, M. Tocchini¹

¹*Lab. Analisi, Azienda Ospedaliero Universitaria, Ospedali Riuniti, Ancona*

Il Propofol (PRF) è un derivato fenolico strutturalmente non correlato ad altri agenti sedativi ed ipnotici. E' stato usato estesamente come agente anestetico, particolarmente per procedure di breve durata. Più recentemente è stato studiato come sedativo in terapia intensiva (TI) ed è stato riscontrato che l'effetto di sedazione ed ipnosi del farmaco è dose dipendente.

L'obiettivo che ci siamo proposti è di mettere a punto un metodo semplice e rapido per la determinazione dei livelli plasmatici di PRF al fine di ottimizzare la terapia del singolo paziente.

Il metodo utilizzato per la determinazione dei livelli plasmatici di PRF nei campioni e nei calibratori prevede l'estrazione in fase solida dell'analita dalla matrice plasmatica. L'analisi viene eseguita in Cromatografia Liquida a Alta Pressione (HPLC) utilizzando una colonna C18 5µm 4.6 x 150 mm, la fase mobile è costituita da 380 ml di tampone fosfato 12 mM a pH 3 e 620 ml di acetonitrile, il flusso applicato è 1 ml/min. L'eluato è monitorato a 220 nm se viene utilizzato un rivelatore UV-VIS a lunghezza d'onda variabile; mentre l'utilizzo del rivelatore a fluorescenza prevede λecc di 275nm e λem di 298nm. Il tempo di eluizione è 12 min.

La retta di regressione $y=95,814x+2,052, R^2=0.999$ è lineare nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,02 e 5 µg/ml. L'estrazione in fase solida di PRF dalla matrice plasmatica permette di concentrare l'analita e di ottenere un recupero medio di $125,5\pm 7,1$. Il limite di quantificazione (concentrazione che può essere determinata con un coefficiente di variazione non superiore al 10%) è 0,02 µg/ml con il rivelatore UV-VIS ed è 0.002µg/ml con il rivelatore fluorimetrico. La precisione e l'accuratezza sono state valutate analizzando in giorni diversi campioni di sangue di donatori a cui sono state aggiunte 3 differenti concentrazioni di PRF.

I coefficienti di variazione variano dall'8,9% all'1,7% confermando che il metodo utilizzato risponde alle esigenze di un dato riproducibile e accurato.

La buona linearità all'interno di un ampio intervallo di concentrazione, la sensibilità e la riproducibilità del metodo permettono di monitorare il PRF sia nei pazienti in TI, sia quando, come nelle donazioni d'organo si deve accertare la non presenza del farmaco nel plasma.

125

EVALUATION OF MULTIGENT® LITHIUM ASSAY ON THE ABBOTT ARCHITECT® C8000 AND AEROSET® CLINICAL CHEMISTRY SYSTEMSF. Rota¹, L. De Angelis¹, R. Vannest², B. Nance²¹*Sentinel CH., Milan, Italy*²*Abbott Diagnostics, Irving, Texas*

Objective. The analytical performance of the MULTIGENT Lithium assay was evaluated on the ABBOTT ARCHITECT c8000 and AEROSET clinical chemistry systems. The goal of the study was to verify whether the analytical performance met the HCFA/CLIA allowed Total Error (<20% or 0.3mmol/L). Acceptance criteria were set to < 5% or 0.075 mmol/L for both Bias (Accuracy) and Total Imprecision to insure that the combined effects of bias and imprecision would meet the HCFA/CLIA requirements.

Materials/instruments. MULTIGENT Lithium, a colorimetric assay manufactured by SENTINEL CH., is based on the use of a chromogenic chelator able to selectively complex lithium ions at alkaline pH. Abbott's ARCHITECT c8000 and AEROSET Systems are random-access clinical chemistry analyzers. ARCHITECT c8000 can be integrated with ARCHITECT i2000SR, an immunoassay module, to form the ci8200.

Design study. Precision was determined at three analyte levels. LOQ was defined as the analyte concentration at which the %CV of the assay is # 20%. Interferences from endogenous substances and from metals were investigated following the Glick protocol. The analytical measuring range (AMR) was defined through linearity. Method comparison consisted of testing patient serum samples on AEROSET or c8000 and the atomic absorption spectrophotometric (AAS) reference method.

Results (measuring units: mmol/L):

Architect c8000: AMR: 0.10 to 3.51; Max Total Imprecision 3.2% at 0.88. LOQ lower than 0.10 mmol/L. Comparison vs AAS: n=62; range 0.11-3.10; Slope 1.06; Intercept -0.04 and r 0.996

Aeroset: AMR: 0.10 to 3.51; Max Total Imprecision 4.0% at 0.84. LOQ lower than 0.10 mmol/L.

Bilirubin (40 mg/dL), Hemoglobin (1000 mg/dL), Intralipid (1500 mg/dL), Calcium (24 mg/dL), Magnesium (6.07 mg/dL), Potassium (13mEq/L), Sodium (350 mEq/L) did not interfere.

Conclusion. The data meet the HCFA/CLIA's imprecision and accuracy requirements on AEROSET and c8000 systems. Interference findings demonstrate the robustness of the assay and its suitability in routine lab use. The MULTIGENT Lithium assay allows consolidation of the therapeutic drug assays with general chemistry on a single high volume chemistry analyzer, which is highly valuable for optimizing workflow and efficiency.

126

RP-HPLC RESOLUTION OF D-/L-PENICILLAMINE AFTER AN ACHIRAL PRE-COLUMN NINHYDRIN-BASED DERIVATIZATIONS. Sotgia¹, A. Zinellu¹, E. Pisanu¹, B. Scanu¹, M. Sanna¹, F. Lai¹, P. Occhineri¹, A. Pisanu¹, L. Deiana¹, C. Carru¹¹*Departement of Biomedical Sciences, Chair of Clinical Biochemistry, University of Sassari*

Penicillamine (Pen) is a non-coded sulfur-containing amino acid discovered as a degradation product of penicillin and clinically used in the treatment of several pathologies such as Wilson's disease, cystinuria and active rheumatoid arthritis. Pen exists as D- (or S) and L- (or R) enantiomer and similarly to others drugs, the toxicological effects of the two stereoisomers differ considerably. Thus, only D-form (eutomer) can be used for therapeutic purposes while L-form (distomer) and racemate mixture are highly toxic. The evaluation of enantiomeric purity of pharmaceutical preparations of D-Pen is, therefore, of the utmost importance. Although direct separations of underivatized enantiomers on chiral stationary phases or by using chiral mobile phases have been described for many compounds, it is not unusual that the sensitivity achieved may be unsatisfactory for most real applications. To this regard, also Pen is a relatively poor absorber in the UV-visible region, therefore, without resorting to derivatization, the discrimination of its stereoisomers may be difficult. In order to enhance sensitivity, in this work we have evaluated the usefulness of an achiral pre-column ninhydrin-based derivatization. The best conditions of reaction were achieved by employing an ethanolic 3%w/v ninhydrin solution and by warming the reaction mixture at 100 °C for 5 minutes in a thermoblock heater. After derivatization, the enantiomers were resolved on a conventional C18 column by using the complex copper(II)-L-proline as a chiral selector in the mobile phase. The use of a copper(II)-L-proline complex/acetonitrile mobile phase appeared to produce the sharpest peaks with no tailing or fronting, leading to the selection of an aqueous solution of 22 mM L-proline and 2 mmol/l copper chloride dihydrate containing 30%v/v acetonitrile as the final mobile phase. By this approach, it was possible to separate derivatized L-Pen and D-Pen enantiomers in 15.6 and 16.6 minutes respectively, by monitoring column eluates either by UV/Visible absorbance (231 nm) or fluorescence (Ex:390 nm; Em:497 nm) detector. The method was able to detect traces of L-Pen in samples of D-Pen below 0.1% and it was found to be stable and useful in the quality control of the bulk material and formulations.

127

**RIVALUTAZIONE IN HPLC DI
ELETTROFEROGRAMMI ANOMALI DI CDT PER
PRESENZA DI COMPONENTI MONOCLONALI**

M.T. Trevisan¹, G. Bonadonna¹, D. Sorio², F. Bortolotti²

¹Dip. Servizi, U.O.A di Laboratorio, Osp.G.Fracastoro, ULSS20, Verona

²Dip. Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina Legale, Università di Verona

Scopo del lavoro. Nella popolazione sopra i 50 anni la frequenza delle componenti monoclonali (c.m.) si aggira tra il 2,5 e il 3,0%. Non essendo la rivelazione in elettroferesi capillare (CE) della CDT specifica per la transferrina (TRF), ma solo per le proteine, la presenza di c.m. migranti in zona "beta" potrebbe interferire nella lettura dei picchi CDT correlati. Scopo del presente lavoro, era valutare l'interferenza che le c.m. hanno sulle determinazioni di CDT eseguite con CE rispetto a determinazioni in HPLC, ove il sistema di rivelazione a 460 nm esclude proteine non legate allo ione ferrico(1).

Materiali e metodi. Sono stati selezionati 20 campioni di siero che presentavano c.m. migranti in zona beta. Gli stessi campioni sono stati sottoposti ad analisi della CDT con metodo in CE ad alta risoluzione ed in parallelo con metodo HPLC(1).

Risultati. Dei 20 campioni analizzati, 9 all'analisi in CE hanno mostrato tracciati in cui le componenti CDT correlate erano mascherate da una interferenza attribuibile alle c.m. In questi ferogrammi il calcolo delle aree dei picchi CDT era impossibile. In altri 9 campioni, invece, i tracciati risultavano non interferiti dalle c.m. e pertanto il calcolo della CDT era possibile. In 2 casi i tracciati mostravano picchi interferenti sovrapposti a picchi CDT correlati, determinando una possibile sorgente di errore di misurazione della CDT. Tutti i tracciati HPLC erano invece esenti da interferenze dovute a c.m. Nei casi di analisi CE interpretabili, i risultati erano in accordo con le determinazioni HPLC.

Conclusioni. La presenza di c.m. può rappresentare una condizione di non interpretabilità dei tracciati provenienti da CE ad alta risoluzione, essendo tuttavia solo raramente potenziale causa di errore di misurazione. Peraltro, nel caso di impiego di sistemi automatizzati di CE a bassa risoluzione si potrebbe accentuare il rischio di errore analitico, e pertanto una conferma sistematica dei risultati con HPLC sembra necessaria.

Bibliografia

1. Bortolotti F et al. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *J Chrom B* 2006; 841:96-109.

128

**DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI
DI CEFUROXIME NELLA GESTIONE DELLA
CHEMIOPROFILASSI CHIRURGICA**

M. Vidali¹, M. Bagnati¹, D. Colangelo², M. Basile¹, C. Boieri¹, I. Viano², G. Buongiorno¹, G. Teodori¹, S. Borrè¹, L. Giuliani¹, G. Bellomo¹

¹Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

²Dip. Scienze Mediche, Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Novara

L'utilizzo di protocolli di profilassi antibiotica nelle strutture di Chirurgia ha come obiettivi la standardizzazione e la razionalizzazione delle procedure. L'analisi retrospettiva dei dati consente di valutare l'efficacia del protocollo adottato ed una sua eventuale modifica. A tale scopo abbiamo misurato con metodica HPLC i livelli plasmatici di cefuroxime in pazienti sottoposti a vari interventi nel Reparto di Cardiocirurgia.

Lo studio ha coinvolto 66 pazienti sottoposti a by-pass aorto-coronarico o sostituzione valvolare non affetti da grave insufficienza renale e/o epatica. Si è utilizzato uno schema profilattico misto, consistente nella somministrazione all'induzione dell'anestesia di 500mg i.v. a bolo e in un'infusione lenta di 8g mantenuta per 24 ore continuative. Campioni di 3ml di sangue sono stati prelevati ad intervalli di tempo noti. 100µl di plasma, dopo deproteinizzazione con 200µl di acido metafosforico, sono stati diluiti in fase mobile. L'analisi è stata condotta in HPLC (C18 150mm x 4,6mm, 5µm), rivelazione UV a 280nm, flusso 0,8ml/min e fase mobile costituita da acetonitrile:fosfato d'ammonio (18:82, v/v). Il limite di sensibilità della metodica è stato di 0,05mg/l con una RSD di 3,2%. Come riferimento è stata utilizzata la minima concentrazione inibente (MIC) degli Staphylococchi di 16-32mg/l.

I livelli plasmatici di cefuroxime indotti dal nuovo protocollo, a differenza di quelli rilevati con lo schema profilattico precedentemente utilizzato (1,5g i.v. all'induzione dell'anestesia, seguiti da 750mg i.m. 3 volte al giorno nelle successive 24-48 ore), risultano costanti e superiori alla MIC per tutta la durata dell'atto chirurgico ed una parte cospicua della rianimazione.

L'applicazione di protocolli infusivi combinati nel caso di farmaci tempo-dipendenti, come il cefuroxime, sembra garantire molteplici vantaggi sul piano della semplicità, dell'accuratezza e della copertura profilattica, anche in tipologie chirurgiche di lunga durata e con pazienti complessi.

Bibliografia

Gentry LO, Birovljev SM, Radovancevic B, Cooley DA. Cefuroxime prophylaxis in cardiovascular surgery: clinical, microbiological and ecological impact. *Tex Heart Inst J* 1992;19(1):21-5.

129

DETERMINAZIONE IN HPLC DI LEVETIRACETAM, LAMOTRIGINA E OXCARBAZEPINA

P. Porta¹, M. Bagnati¹, M. Vidali¹, M. Basile¹, R. Cantello², C. Civardi², A. Fortina¹, C. Cassani¹, N. Atzeni¹, M. Albertario¹, M. Bertinazzi¹, C. Boieri¹, D. Scarano¹, G. Bellomo¹

¹Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

²Clinica Neurologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

Levetiracetam (LEVE), lamotrigina (LAMO) e oxcarbazepina (OXCA) sono frequentemente utilizzati come farmaci in monoterapia o in associazione per il trattamento delle crisi parziali con o senza generalizzazione secondaria e per le crisi tonico-cloniche. Come per altri farmaci antiepilettici, il loro monitoraggio plasmatico gioca un ruolo rilevante nella valutazione dell'efficacia terapeutica, nell'ottimizzazione della terapia e nel controllo delle interazioni farmacologiche. Scopo del lavoro è stato sviluppare una metodica in HPLC di semplice e rapida esecuzione utile nel monitoraggio terapeutico di pazienti con epilessia. 100µl di plasma sono deproteinizzati con 200µl di acido metafosforico 10%. Dopo centrifugazione, 200µl di surnatante sono diluiti con 200µl (LEVE) o 400µl (LAMO/OXCA) di fase mobile costituita da tampone fosfato 20mM pH 6 (LEVE) o 6,5 (LAMO/OXCA) e acetonitrile 3% (v/v) (LEVE) o 20% (LAMO/OXCA). L'analisi è condotta in HPLC in fase inversa (LEVE: C8 100mm x 4,6mm, 5µm; LAMO/OXCA: C18 150mm x 4,6mm, 5µm) con rilevazione UV a 212nm, flusso 1ml/min (LEVE) o 1,2 (LAMO/OXCA). Come calibratore si utilizza un pool di sieri bianchi a cui è stata aggiunta una quantità nota di standard. L'oxcarbazepina viene valutata tramite dosaggio del suo metabolita attivo (10,11-diidro-10-idrossi-carbamazepina; MHD).

Il metodo per il dosaggio del levetiracetam è lineare tra 0,5 e 100mg/l ($R^2=0,9991$), con un limite di sensibilità di 0,2mg/l e una RSD di 2,3%. Il metodo per la lamotrigina e l'oxcarbazepina è lineare rispettivamente tra 1 e 100mg/l ($R^2=0,9984$) e tra 0,5 e 80mg/l ($R^2=0,9997$), con un limite di sensibilità di 0,3mg/l e RSD di 1% (LAMO), e 0,1 mg/l e RSD 0,6% (OXCA). Da maggio 2006 a giugno 2008 nel nostro laboratorio sono state effettuate 336 determinazioni per MHD (media 15,9; ds 8,5; min-max 0,1-48,2), 190 per LAMO (media 5,1; ds 3,6; min-max 0,3-18,6) e 93 per LEVE (media 21,7; ds 19,4; min-max 0,2-121).

Le metodiche descritte sono rapide (tempo complessivo inferiore a 15 min), semplici e robuste e consentono la determinazione contemporanea di più farmaci.

Bibliografia

Tomson T, Johannessen SI. Therapeutic monitoring of the new antiepileptic drugs. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2000;55:697-705.

130

DETERMINAZIONE IN HPLC-DAD DI OPIACEI E COCAINA E METABOLITI SU URINA

M. Bagnati¹, M. Vidali¹, P. Porta¹, N. Atzeni¹, M. Albertario¹, M. Bertinazzi¹, C. Boieri¹, D. Scarano¹, G. Bellomo¹

¹Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

Attualmente il test di conferma per le droghe di abuso, dopo metodiche di screening, viene effettuato con test di tipo cromatografico. In questo lavoro viene presentato un metodo in HPLC-DAD per confermare e quantificare la presenza di droghe di abuso su urina, che non necessita di procedure critiche di derivatizzazione, richieste in gascromatografia, e con strumentazione di costo alla portata dei normali laboratori.

1 ml di urina viene estratto mediante procedura SPE e ripreso in 150µl di fase mobile dopo evaporazione. L'analisi viene eseguita mediante eluizione in gradiente binario multistep con tampone fosfato 20mM pH 6,86 e acetonitrile, utilizzando una colonna C18 100mm x 4,6mm, 3,5µm, temperatura 30°C, flusso 1,2ml/min, 20µl di iniezione. La rilevazione viene seguita a 233nm con registrazione dello spettro UV da 200 a 400nm. Come calibratori si utilizzano un pool di urine bianche a cui sono state aggiunte quantità note e crescenti di standard. Come standard interno si utilizza nalorfina.

Il metodo di dosaggio presenta per i vari analiti i seguenti range di linearità (ng/ml) e LOD (ng/ml): morfina (100-5000, $r^2=0,987$, 50), codeina (100-5000, $r^2=0,999$, 50), 6-monoacetilmorfina (50-2500, $r^2=0,997$, 30), cocaina (50-2500, $r^2=0,999$, 30), benzoilecgonina (100-5000, $r^2=0,994$, 50). L'identificazione delle singole sostanze avviene sia mediante corrispondenza con il tempo di ritenzione, sia per confronto con lo spettro UV registrato in libreria.

La metodica HPLC-DAD descritta consente di eseguire il test di conferma per gli analiti considerati con un livello di quantizzazione inferiore al cut-off di conferma. Inoltre l'identificazione è garantita per confronto sia del tempo di ritenzione, sia con lo spettro UV presente in libreria, utilizzando criteri stringenti (match 99%). In conclusione, il dosaggio di droghe d'abuso in HPLC-DAD si dimostra essere uno strumento che risponde completamente ai parametri richiesti per un test di conferma.

Bibliografia

Fernández P, Vázquez C, Morales L, Bermejo AM. Analysis of opiates, cocaine and metabolites in urine by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *J Appl Toxicol* 2005;25(3):200-4.

131

**DOSAGGIO DI AMOXICILLINA E
CHEMIOPROFILASSI IN PAZIENTI PEDIATRICI
SOTTOPOSTI A TONSILLECTOMIA**

M. Vidali¹, G. Averono², M. Olina², G. Borello², M. Bagnati¹, M. Basile¹, C. Guglielmetti², F. Pia², G. Bellomo¹

¹Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

²Clinica Otorinolaringoiatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

La tonsillectomia è l'intervento più praticato in età pediatrica in Italia. Le complicanze che più spesso accompagnano il decorso post-operatorio possono dipendere dalla batteriemia che segue l'intervento. È perciò necessaria un'adeguata profilassi volta a ridurre la morbilità e i tempi di recupero dopo intervento. Scopo del lavoro è stato valutare in HPLC le concentrazioni sieriche e tonsillari di amoxicillina in pz pediatrici sottoposti a tonsillectomia dopo profilassi orale.

Lo studio ha coinvolto 33 pz di età inferiore a 14 anni (media 5,9; range 3-11) con tonsillite cronica, trattati con amoxicillina-acido clavulanico per os (3 dosi, calcolate in base al peso, nelle 24 ore precedenti e 1 dose ulteriore 2 ore prima dell'intervento, somministrate dai genitori). 100µl di omogenato di tessuto tonsillare e 50µl di siero, diluiti rispettivamente con 100 e 150µl di fase mobile (buffer fosfato 20mM pH=3:acetonitrile 96:4), dopo deproteinizzazione e centrifugazione, sono stati analizzati in HPLC/UV. La concentrazione di amoxicillina nell'omogenato è stata corretta sottraendo il contributo del sangue presente nel tessuto tonsillare. Come riferimento sono state utilizzate le MIC da letteratura.

La concentrazione sierica media di amoxicillina era 5,7µg/ml (ds 4,0; range 0,4-14,3) mentre quella tissutale 1,8µg/g (ds 2,4; range 0,4-12,9). Questi livelli non garantiscono una protezione dai patogeni associati alle infezioni delle alte vie respiratorie. 20 e 10 dei 33 pz presentavano livelli inferiori al LOD (0,7µg/g), rispettivamente in 1 o in entrambi gli omogenati tonsillari. Dei 17 pz con livelli sierici superiori a 4µg/ml (MIC90 per i patogeni considerati), 5 presentavano livelli tonsillari non dosabili.

Questo studio ha evidenziato la necessità di una revisione dello schema profilattico per garantire livelli di antibiotico efficaci a livello tissutale. Tuttavia, le basse concentrazioni sieriche presentate da alcuni pz suggeriscono che la somministrazione nei bambini debba essere attentamente controllata, qualora questa venga delegata unicamente ai genitori.

Bibliografia

Gaffney RJ, Walsh MA, McShane DP, Cafferkey MA. Post-tonsillectomy bacteraemia. *Clinical Otolaryngology* 1992;17:208-10.

132

**RAPIDA DETERMINAZIONE DELLA
CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI PROPOFOL IN
HPLC**

N. Atzeni¹, M. Bagnati¹, M. Vidali¹, P. Porta¹, M. Albertario¹, M. Bertinazzi¹, C. Boieri¹, D. Scarano¹, G. Bellomo¹

¹Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

Il Propofol è un anestetico endovenoso usato per l'induzione e il mantenimento dell'anestesia, e per la sedazione di pazienti in terapia intensiva. Per una diagnosi di morte cerebrale è necessario che le concentrazioni plasmatiche di farmaci ad azione centrale siano inferiori al range terapeutico. In mancanza di un dosaggio plasmatico è utile, prima della definizione di morte cerebrale, un'attesa pari o superiore al tempo di dimezzamento del farmaco; tuttavia, a parità di schema terapeutico, i livelli plasmatici variano notevolmente in base al diverso metabolismo ed eliminazione del farmaco presentati dal paziente. Scopo del lavoro è stato sviluppare un metodo semplice e rapido per valutare la concentrazione plasmatica di propofol, utile nel monitoraggio di pazienti in terapia intensiva e di supporto nella diagnosi di morte cerebrale.

100µl di plasma diluiti con 200µl di acetonitrile sono deproteinizzati con 10µl di acido perclorico. L'analisi è condotta in HPLC in fase inversa con rilevatore a fluorescenza (EX 270nm, EM 300nm), flusso 1,4ml/min e fase mobile costituita da acetonitrile:acqua (70:30, v/v). Come campioni a concentrazione ignota sono stati utilizzati sieri di pazienti ricoverati nel reparto di terapia intensiva sottoposti a vari schemi terapeutici.

Nelle prove effettuate, utilizzando acido perclorico, o in alternativa acido metafosforico 10% (w/v), come agente precipitante, il recupero è risultato del 100% (±2%). Il metodo è lineare tra 0,1 e 100mg/l (R²=0,9995). Il limite di sensibilità della metodica è stato di 0,05mg/l con una RSD di 8,4%. Tutti i plasmati testati presentavano concentrazioni di propofol superiori al limite di sensibilità.

A differenza di altre metodiche descritte in letteratura, non si ha perdita di propofol a seguito della deproteinizzazione. Il metodo (preparativa ed analisi) risulta essere molto veloce (tempo totale inferiore a 20 minuti) e facilmente applicabile, adattandosi bene ai tempi e alle richieste in carattere di urgenza dei reparti di terapia intensiva.

Bibliografia

Cussonneau X, De Smet E, Lantsoght K, Salvi JP, Bolon-Larger M, Boulieu R. A rapid and simple HPLC method for the analysis of propofol in biological fluids. *J Pharm Biomed Anal* 2007;27;44(3):680-2.

133

RAPIDA DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI TIOPENTALE IN HPLC

D. Scarano¹, M. Bagnati¹, M. Vidali¹, P. Porta¹, N. Atzeni¹, M. Albertario¹, M. Bertinazzi¹, C. Boieri¹, G. Bellomo¹

¹Lab. di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

Il tiopentale è un tiobarbiturico ad azione ipnotica utilizzato nell'induzione dell'anestesia generale e del coma artificiale. Come per altri farmaci ad azione centrale con effetto fortemente deprimente sull'attività neuronale, risulta importante, per una diagnosi corretta di morte cerebrale, la dimostrazione di livelli plasmatici non efficaci. Scopo del lavoro è stato sviluppare una metodica di semplice e rapida esecuzione per valutare la concentrazione plasmatica di tiopentale, utile nel monitoraggio di pazienti in terapia intensiva e di supporto nella diagnosi di morte cerebrale.

100µl di plasma o siero diluiti con 200µl di acetonitrile sono deproteinizzati con 5µl di acido perclorico. L'analisi è condotta in HPLC in fase inversa (C18 100mm x 4,6mm, 3,5µm) con rilevazione UV a 288nm, flusso 1,0ml/min, temperatura 30°C e fase mobile costituita da tampone fosfato 20mM pH 5,0:acetonitrile (60:40, v/v). Come calibratore si utilizza un pool di sieri bianchi a cui è stata aggiunta una quantità nota di standard. Come campioni a concentrazione ignota sono stati utilizzati sieri di pazienti ricoverati nel reparto di terapia intensiva sottoposti a vari schemi terapeutici.

La curva di calibrazione del tiopentale era lineare tra 1 e 100mg/l ($R^2=0,99996$). Il limite di sensibilità della metodica è stato di 0,5mg/l (RSD di 9,8%), inferiore al range terapeutico della molecola (1-5mg/l). Il recupero è risultato del 100% ($\pm 2\%$). Tutti i sieri testati presentavano concentrazioni di tiopentale superiori al limite di sensibilità della metodica. Come descritto in letteratura, in prossimità del tiopentale si è osservato un picco corrispondente ad un isomero del farmaco (rapporto aree isomero/tiopentale 3,59% ds 0,04%).

Il metodo (preparativa ed analisi) risulta essere molto veloce (tempo complessivo inferiore a 20 minuti) e facilmente applicabile, adattandosi bene ai tempi e alle richieste in carattere di urgenza dei reparti di terapia intensiva.

Bibliografia

Meinitzer A, März W, Mangge H, Halwachs-Baumann G. More reliable brain death diagnosis with chromatographic analysis of midazolam, diazepam, thiopentone, and active metabolites. *J Anal Toxicol* 2006;30(3):196-201.

134

PREDICTORS OF SEVERE HYPERBILIRUBINEMIA IN HIV INFECTED PATIENTS TREATED WITH ATAZANAVIR (ATV)

A. Barassi¹, O. Turri², M. Casana³, P. Cicconi³, T. Bini³, L. Comi³, F. Pateri², M.L. Biondi², A. d'Arminio Monforte³, G.V. Melzi d'Eril¹

¹Dep. of Medicine, Surgery and Dentistry, San Paolo Hospital, University of Milan, Milan, Italy

²Lab. of analysis, San Paolo Hospital, Milan, Italy

³Clinic of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Dep. of Medicine, Surgery and Dentistry, San Paolo Hospital, University of Milan, Milan, Italy

Hyperbilirubinemia is the most common laboratory abnormality in patients treated with ATV; bilirubin plasma levels have been correlated with ATV plasma concentration (S. Rodriguez-Novao, AIDS 2007). In this study we analysed the relationships between hyperbilirubinemia, Gilbert's syndrome and ATV plasma concentration.

HIV-infected subjects on ATV/ritonavir containing stable HAART regimen were included. ATV plasma concentrations were measured 24 hours after the last dose by HPLC. Polymorphism at the uridin-glucuronosyl-transferase 1A1 (UGT1A1) were examined in DNA extracted from blood mononuclear cells to identify subjects with Gilbert's syndrome. The correlation between bilirubin plasma levels, ATV concentration and polymorphism of UGT1A1 (defined as the presence than at least one TA7 allele) were evaluated by multivariate linear regression (other covariates included: gender, age, CD4 count, months of ATV exposure). Predictors of severe hyperbilirubinemia (>2.5 mg/dL; grade 3) were evaluated by multivariate logistic regression (polymorphism at UGT1A1, Cmin, BMI, age included as covariates).

Forty-four patients, 27.3% females, median age of 42.5 years, median BMI of 23.88 (IQR 21.8-25.8) were analysed. The distribution of different polymorphism at UGT1A1 was: 45.4% TA6/TA6, 40.9% TA6/TA7, 13.7% TA7/TA7. The median ATV exposure was 17 months (IQR 7-32), the median Cmin ATV plasma concentration was 0.60 µg/mL (IQR 0.41-0.97) and the median plasma bilirubin levels was 2.48 mg/dL (IQR 1.24-3.95). Twenty-two (50%) patients experienced severe hyperbilirubinemia; among those, the proportion of patients with polymorphism was higher: 72% vs 36% without severe hyperbilirubinemia (chi-sq $p=0.01$). In multivariate linear regression analysis total bilirubin was directly correlated to polymorphisms at UGT1A1 (β 1.52 SE 0.61 $p=0.01$), to Cmin ATV plasma levels (β 1.42, SE 0.47 0.04) and to age (β 0.08 SE 0.03 $p=0.007$). Polymorphism at UGT1A1 (AOR 6.6, 95%CI 1.34-32.6, $p=0.02$) and BMI (for every additional unit AOR 0.66, 95%CI 0.45-0.97, $p=0.03$) were the only independent predictors of severe hyperbilirubinemia.

Screening for Gilbert's syndrome could be an important tool in patients with a ATV/ritonavir containing HAART regimen, in order to predict severe hyperbilirubinemia.

135

DOSAGE OF IMMUNOSUPPRESSANTS DRUGS: COMPARISON BETWEEN IMMUNOASSAY METHOD AND HPLC-MS/MS

V. Bianchi¹, F. Martino¹, A. Pinca¹, G. Sida¹, C. Arfini¹, M. Ehrhardt²

¹Dip. Patologia Clinica, AO SS Antonio e Biagio e C Arrigo, Alessandria, Italy

²Recipe Chemicals and Instruments, Munich, Germany

Monitoring blood levels of immunosuppressants is essential to assess organ rejection versus toxicity, because of the narrow therapeutic range and pharmacokinetic variability. The aim is to compare the results obtained with immunoassay (FPIA e MEIA) and reference method (HPLC-MS/MS).

Materials and Methods. We analyzed 93 whole blood samples of kidney transplant recipients in single or multiple therapy with cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus by IMX and TDX, and with reagent Recipe on HPLC-MS/MS API 3000.

Results. The regression lines and correlations:
Calibrators:

Cyclosporine A = $1.061x + 6.6972$, $R^2 = 0.9983$;

Tacrolimus $y = 1.053x + 0.162$, $R^2 = 0.9998$;

Sirolimus $y = 1.335x + 0.495$, $R^2 = 0.999$.

Patients (Monotherapy):

Cyclosporine A $y = 0.951x + 18.056$, $R^2 = 0.9657$;

Tacrolimus $y = 1.051x - 0.296$, $R^2 = 0.8824$;

Sirolimus $y = 0.735x + 0.133$, $R^2 = 0.8703$.

Patients (Politherapy):

Tacrolimus $y = 0.948x - 0.077$, $R^2 = 0.7743$;

Sirolimus $y = 0.674x + 0.5799$, $R^2 = 0.8717$.

The measures of calibrators at nominal value 0-100-250-500-1000-1550 ng/ml by HPLC-MS/MS were resulted for Cyclosporine A 6-112-258-534-1115-1570; for Tacrolimus 0-3-6-1-20-30 calibrators were 0-3.21-6.6-13.0-21.4-31.6; for Sirolimus 0-3-6-12-20-30 were 0-3.9-6.9-15.2-26.0-40.0

Considerations and Conclusions. From our experiment it is evident that: the calibrators used for the evaluated immunoassay were prepared with the molecular base of the drug. When compared with the reference technique: the results for Cyclosporine by FPIA is comparable in a broad concentration range; the results for Tacrolimus and Sirolimus by MEIA is higher in monotherapy than in politherapy with values that are dispersed enough in the latter case. If we assume that by HPLC-MS/MS "true" concentration is measured, the assigned value to the calibrators is lower than 3-12% (Cyclosporine A) than 5-10% (Tacrolimus) than 14-33% (Sirolimus). The immunoassay for Tacrolimus and Sirolimus, in particular in association, were critical. Probably this is the results between two events: Manufacturer assigned lower values to the calibrators to avoid overestimate drugs levels and at the same time antibody-antigen complex is influenced by several metabolites. In conclusion, it is advisable to use a HPLC-MS/MS system even in regards to economic factors.

Reference. 1. Koal T. J Chromatogr B 2004;805:215-21.

136

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ATAZANAVIR, EFAVIRENZ AND LOPINAVIR BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH UV DETECTION

A. Barassi¹, F. Pateri¹, L. Musazzi¹, G.V. Melzi d'Eril¹

¹Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Polo Universitario San Paolo, Università degli Studi di Milano, Milano

Introduction. An accurate, sensitive, and specific reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) assay for the simultaneous quantitative determination of atazanavir, lopinavir and efavirenz in human blood plasma was described.

Material and methods. After viral inactivation by heat (60°C for 60 min), plasma (250 µL), with 6,7-dimethyl-2,3-di-(2-piridil)-quinoxaline as internal standard, was extracted with hexane/ethylacetate from buffered samples with a borate buffer (0.19 M, pH 9.0). The extracted organic phase was evaporated under nitrogen at room temperature and reconstituted in 200 µL of the mobile phase (60% acetonitrile, 40% phosphate buffer pH 7.2). A 50 µL volume was subjected to HPLC isocratic analysis onto a 5 µm Hyper-syl C18 (Agilent).

Results. Atazanavir, lopinavir and efavirenz were detected by UV at 220 nm at a retention time of 10.2, 15.0 and 18.6 min, respectively. The total run time for a single analysis was 25 min, including the washing-out and re-equilibration step. The calibration curve was linear over the range 0.05-100 µg/mL. The absolute recovery was always higher than 60%. The mean intra-assay and inter-assay precision was always lower than 5.1% and 11.3%, respectively. The limit of quantification for atazanavir and lopinavir was 0.05 µg/mL and for efavirenz 0.10 µg/mL.

Conclusion. The proposed method, relatively time consuming, has been developed using instruments usually available in conventional hospital laboratories. It is specific, precise and the limits of quantification are consistent with trough plasma concentrations. Our method, enabling such a concentration-oriented approach, represents a useful complement to the current monitoring of anti-HIV treatment based on CD4 count and viremia.

137

DOSAGGIO NELLE URINE DELL'ETILGLUCURONIDE (EtG) SU PIATTAFORMA TECNOLOGICA ADVIA 2400V. Bianchi¹, C. Arfini²¹Lab.di Tossicologia²Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e C Arrigo, Alessandria

Scopo. L'etil glucuronide (EtG), metabolita minore dell'etanolo è un marcatore urinario sensibile e specifico per valutare un recente (3-4 giorni) consumo di alcol. Scopo di questo lavoro è valutare l'applicazione di un kit commerciale su ADVIA 2400.

Materiali e Metodi. Reagenti, calibratori e controlli DRI-EtG EIA, Microgenics, IL, Milano)

Materiale di controllo aggiuntivo: Medichem Germania Strumentazione: ADVIA 2400 (Siemens Medical Solutions)

Campioni: urine da pazienti ambulatoriali con concentrazioni di EtG fino a 3.5 mg/L

Risultati. Sono stati ottimizzati i seguenti parametri strumentali:

volume 1° e 2° reagente: 40 ul, volume campione: 25 ul, diluizione automatica campione 1:2, tempo reazione 10 min, λ 340 e 410 nm, cinetica RRA, calibrazione 5 punti, aumento della curva, lettura a 20, 25 e 30 sec

Sono stati valutati

-imprecisione: CV% 2.22 nella serie, CV% 2.74 tra le serie su cinque replicati in una settimana

-linearità: fino a 3.5 mg/L

-sensibilità analitica: stimata intorno a 0.1 mg/L

-recupero: 100%, 101%, 99,7%, 94,3%, 92% rispettivamente per concentrazioni inferiori a 0.5 mg/L, circa 1.0 mg/L, circa 1.5 mg/L, circa 2.5 mg/L, circa 3.5 mg/L

- la stabilità della curva di calibrazione con reattivi on board: dopo 8 giorni aumento dei controlli a diverse concentrazioni 2,4-3.9%

Considerazioni e Conclusioni. Il dosaggio immunoenzimatico valutato presenta ottime performance di linearità, imprecisione, recupero, stabilità dei reattivi. Trova pertanto la sua ottimale applicazione per scopi clinici e riabilitativi. Qualora venga utilizzata per scopi forensi si raccomanda la conferma in HPLC-MS/MS dei risultati positivi, anche se è stata dimostrata un'ottima correlazione con questa tecnica (1). Gli stessi autori su una popolazione di circa 350 campioni con un cut-off 0.5 mg/L individuano 3 falsi negativi, con un cut-off 1.0 mg/L individuano 2 falsi negativi. Resta allora ancora aperta la condivisione del cut off da utilizzare, anche se 0.5 mg/L potrebbe sembrare il più appropriato.

Bibliografia

1. Böttcher M, Beck O, Helander A "Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing" Alcohol Alcohol 2008;43:46-48.

138

TRANSFERRINA CARBOIDRATO-CARENTE (%CDT) IN HPLC: DEFINIZIONE DI INTERVALLO DI RIFERIMENTO E VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI ETÀ E SESSOV. Bianchi¹, A. Ivaldi¹, M. Bagnati², M. Vidali², G.Bellomo², C. Arfini¹¹Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C Arrigo, Alessandria²Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

Scopo del lavoro. La transferrina carboidrato-carente (CDT) è considerata un marcatore biochimico altamente specifico di abuso alcolico cronico tanto da venire utilizzato in ambito medico legale. La restrizione della libertà personale che può derivare dalla sua determinazione impone l'utilizzo di un metodo validato e la definizione di valori di riferimento calcolati su un'adeguata popolazione. A tale scopo abbiamo misurato i valori di CDT% (% disialotransferrina) in pazienti astemi o moderati bevitori afferenti al Laboratorio e valutato l'effetto delle variabili età e sesso.

Materiali e Metodi. Campioni: 652 pazienti (336 uomini, 316 donne) astemi o bevitori moderati (<210 o <140g/sett rispettivamente per uomini e donne). Il consumo alcolico è stato valutato tramite intervista effettuata da personale medico addestrato

Strumentazione e reagenti: HPLC Agilent serie 1100 con kit %CDT by HPLC Bio-Rad (Hercules, USA)

Analisi statistica: software SPSS v.15.0 (SPSS Inc, Chicago, USA, 2006)

Risultati. La distribuzione dei valori di %CDT nella popolazione in studio era caratterizzata da una forte asimmetria positiva con una mediana di 0.84% (IQ range 0.68-0.99, min-max 0.42-1.79). Gli uomini presentavano livelli significativamente superiori alle donne (0.87, 0.73-1.01 vs 0.80, 0.65-0.97; $p < 0.001$). Nessuna associazione era invece presente tra età e %CDT sia nella popolazione generale, sia nei sottogruppi per sesso. I valori di riferimento calcolati come percentili (97.5, 99, 99.5, 99.9) sono 1.4, 1.6, 1.7, 1.8% nella popolazione generale mentre 1.5, 1.6, 1.7, 1.8% e 1.4, 1.5, 1.6, 1.7% rispettivamente nei maschi e nelle femmine

Conclusioni. I nostri risultati sono in accordo con quanto riportato precedentemente in ambito internazionale (Helander 2008). L'adozione di valori di riferimento differenti per uomini e donne, sebbene supportato dai dati, richiede cautela in quanto le differenze osservate potrebbero dipendere dal campionamento o da una differente proporzione di soggetti bevitori moderati nei due sottogruppi.

Bibliografia

Bergstrom JP, Helander A. Clinical characteristics of CDT (%Disialotransferrin) measured by HPLC: sensitivity, specificity, gender effects, and relationship with other alcohol biomarkers. Alcohol Alcohol 2008;43:436-41.

139

ANALOGUES OF VITAMIN E EPITOMISED BY ALPHA-TOCHOPHEROL SUCCINATE (ALPHA-TOS) FOR PANCREATIC CANCER TREATMENT: "IN VITRO" RESULTS INDUCE CAUTION FOR "IN VIVO" APPLICATIONS

E. Greco¹, E. Fadi¹, P. Fogar², D. Basso¹, A. Padoan¹, C. Zambon², F. Navaglia¹, A. Stranges¹, S. Pedrazzoli², M. Plebani¹

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Az. Osp., Padova, Italy

²Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Univ. Padova, Italy

Background. "Mitocans" destabilise mitochondria, causing apoptogenic factors' release. "Mitocans" include α -TOS, thought to be toxic only for cancer cells.

Aims.

1. verify α -TOS effects on pancreatic cancer (PC) and normal cell growth;
2. ascertain whether the combination of non toxic α -TOS and 5-FU dosages causes cancer cell death;
3. obtain insights into caspase3 activation.

Methods. Five PC cell lines and normal monocytes were cultured in 1% and 10% FCS, without or with α -TOS (5,10,20,50,100,200 and 500uM), for three days. Two cell lines were treated with 5-FU (0.0001mM) and α -TOS (20 and 50uM) alone or in combination. Cell growth (XTT) and caspase3 activity (colorimetric method) were measured.

Results. In 1% FCS, 20uM or more α -TOS inhibited PC cell growth (F= 57.9, p<0.001, BxPC3; F=91.8, p<0.001, Capan1; F= 54.4, p<0.001, MIAPaCa2; F=48.9, p<0.001, Panc1; F=110.6, p<0.001, PSN1). In 10% FCS the same effect was obtained with higher α -TOS dosages (100, 200 and 500uM). α -TOS dose dependently inhibited monocytes' growth in 1% FCS (F=110.5, p<0.001); 100uM or more were effective in 10% FCS (F=83.8, p<0.001). PSN1 growth (F=658, p<0.001), not Capan1 (F=63, p<0.001), was delayed after non toxic 5-FU and α -TOS combination. PSN1 and monocytes caspase3 activity doubled after 5-FU, α -TOS or their combination (0.036 to 0.066 pmol/min/ug prot).

Conclusions. PC cells are sensitive to high α -TOS dosages, not safe for normal cells. Treatment with safe α -TOS and 5-FU dosages caused only a transient PC cell growth inhibition. α -TOS activated caspase3 both in neoplastic and normal cells. Our findings highlight the limitations of this molecule for "in vivo" applications and the need for searching new compounds.

Reference

Neuzil J, Tomasetti M, Zhao Y, Dong LF, Birringer M, et al. Vitamin E analogs, a novel group of "mitocans," as anticancer agents: the importance of being redox-silent. *Mol Pharmacol* 2007;71(5):1185-99.

140

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF ENANTIOSELECTIVE CHIRAL HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETERMINATION OF METHADONE ENANTIOMERS IN HUMAN PLASMA

A. Michahelles¹, G. Mannaioni², R. Ciuti¹

¹Centro Reg. di Riferimento per il dosaggio di farmaci e droghe, A.O.U. Careggi, Firenze, Italy

²Dip. Farmacologia, Università degli Studi, Firenze, Italy

Objectives. Methadone is generally used as the racemic mixture of R and S-methadone. The analgesic and abstinence relieving effects are due to the R-enantiomer. Clinical studies demonstrate that R-methadone is a more potent μ -opioid receptor agonist than S-methadone. The pharmacokinetics of methadone is also enantiomer-selective: a higher C max is found for S and a longer elimination half-life is found for R and a higher percent binding of S than R to plasma proteins. Inactive S methadone contaminates racemic R/S methadone mixtures, and increases the methadone dose needed to provide pain relief or prevent opiate craving. Since replacing R/S methadone with safer R methadone would reduce methadone cardiotoxicity and dangerous methadone half life variations. United States methadone patients deserve treatment with the safer R methadone also used in Germany. Recent studies of cytochrome P450 (CYP) enzymes have identified a consistent role for CYP3A4 and CYP2B6 and that CYP2B6 was much more active at metabolizing S-methadone. The aim of our study is to evaluate the through levels of R- and S- methadone in plasma in methadone maintenance patients at different dose (25-70mg/daily).

Methods. A stereoselective and sensitive HPLC method was developed to separate and quantify both enantiomers of methadone in human plasma.

The enantiomers of Methadone were extracted from human serum by solid - phase procedure.

An AGP chiral coloumn was used for enantioseparation of (-)-(R)- Methadone and (+)-(S)-Methadone. (-)-(R)- Methadone, (+)-(S)-Methadone and imipramina as an internal standard are detected by UV detection (210 nm). Racemic methadone was purchased from Salars. R-Methadone was purchased from CNP "Centre de neurosciences psychiatriques", Lausanne(CH).

Results. In serum the average for R-Met was 147±34ng/ml; S-Met=159± 30ng/ml; R/S= 0.94± 0.19

Conclusions. Preliminary data demonstrated a significant correlation between methadone dose and serum concentration of R and S-methadone. The ratio of R/S confirmed stereoselectivity in methadone metabolism with high individual variability.

References

Valentová J et al. Stereoselective determination of methadone and its main metabolite in serum and urine from methadone maintenance patients. *Neuro Endocrinol lett* 2006;27:130-33.

141

SCREENING DELLA MALATTIA CELIACA IN PAZIENTE CON BRONCOPOLMONITE VIRALE: UN CASO DI FALSA POSITIVITA'

C. Brera¹, C. Fontanella¹, M. Gasparin², F. Pavesi¹¹ Lab, analisi, Osp. Maggiore, Lodi² Eurospital S.p.A., Trieste

Introduzione. Gli anticorpi anti-transglutaminasi tissutale (tTGA), rappresentano il marcatore immunologico più sensibile e più usato per lo screening della Malattia Celiaca (MC). In letteratura vengono segnalati casi di false positività per tTGA in pazienti con infezioni febbrili acute, mononucleosi, faringiti e varicella.

Caso clinico. Segnaliamo in questo lavoro un caso di falsa positività, in un bambino di 7 anni con manifestazioni cliniche di sospetta MC inviato al nostro laboratorio per la ricerca di tTGA IgA ed IgG, anticorpi anti-endomisio (EMA) di classe IgA ed IgA totali e concomitante broncopolmonite di probabile natura virale.

Metodi. Determinazione in ELISA degli tTGA (Eu-tTG IgA e IgG, Eurospital). Rilevamento degli EMA in IFI su esofago di scimmia (Antiendomysium, Eurospital). Dosaggio IgA totali (BNA, Dade Behring).

Risultati. tTGA IgA: 98 U/ml (cut-off 9.0), tTGA: IgG 4.0 (cut-off 20 U/ml), EMA IgA assenti, IgA totali 200mg/dl (V.R. 70-400 mg/dl). Vista l'incongruenza fra i risultati (tTGA IgA positivi ed EMA IgA negativi) è stata eseguita sul siero del paziente la ricerca degli tTGA (IgA) in ELISA utilizzando 3 micropiastre coattate rispettivamente con tTG nativa, con tTG ulteriormente purificata in SDS-PAGE e con tTG denaturata. Col siero del paziente sono stati ottenuti valori di D.O. elevati in tutte e 3 le piastre; mentre i calibratori ottenuti con sieri di celiaci a dieta libera hanno dato D.O. alte, proporzionali alla concentrazione anticorpale contenuta, nella prima e nella seconda micropiastro e D.O. pari a quella del bianco, ovvero non hanno reagito con la tTG denaturata nella terza micropiastro. La tecnica del Dot Blot mostrava che il siero del paziente reagiva sia con la tTG nativa che con quella denaturata, mentre un siero di paziente celiaco (controllo positivo) reagiva solo con la tTG nativa e non con la tTG denaturata. Ripetuti a distanza di tre mesi dalla guarigione del focolaio broncopolmonare, gli tTGA IgA erano negativi (6.0 U/ml), gli EMA IgA assenti e HLA DQ/DQ8 negativi.

Conclusioni. I valori di tTGA IgA positivi erano verosimilmente da attribuire alla presenza nel siero del paziente, di anticorpi policlonali legati all'infezione.

Bibliografia

Clemente MG et al. antitissue transglutaminase antibodies outside celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:31-4.

142

IDENTIFICATION OF IMMUNOGLOBULINS E-BINDING PROTEINS FROM LOLIUM PERENNE POLLEN BY PROTEOMIC APPROACH

M. De Canio¹, C. Sacchetti¹, S. D'Aguanno², F. Petrucci³, M. Nuccetelli¹, O. Forini¹, A. Urbani², S. Bernardini¹, G. Federici¹¹ Dip. di Medicina Interna, Università di Tor Vergata, Roma² Centro Europeo Ricerca sul Cervello, IRCCS-Fondazione Santa Lucia, Roma³ Centro Studi sull'Invecchiamento (Ce.S.I.), Chieti

Allergic diseases are caused by immune system activation in response to harmless environmental substances. These hypersensitivity reactions are mediated by IgE antibodies which, binding specific membrane receptors of basophils and tissue mast cells, cause the release of inflammatory mediators as histamine, cytokines, leukotrienes, that finally elicit allergic symptoms. Pollens are the most frequent cause of seasonal allergic rhinitis, affecting about 20% of European population. Although allergic pollen species are known among grasses, weeds and trees, most of them belong to a unique taxonomical family, Poaceae, also including *Lolium perenne* (ryegrass).

Pollen allergens are water-soluble proteins or glycoproteins, which make them readily available to the immune system recognition. Proteomics played a pivotal role in molecular characterization of these allergy-eliciting molecules. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was successfully employed to resolve complex allergen sources, separate different allergen isoforms, study post-translation modification while mass spectrometry analysis, combined with database search, provided powerful tools to identify novel allergens¹.

The aim of this work was the proteomic characterization of a ryegrass pollen extract, a well-known allergen source, in order to highlight allergen components. A shotgun analysis performed by nanoLiquid chromatography-mass spectrometry allowed recognition of all allergens previously described in ryegrass pollen, including polcalcin, identified by homology with other grass allergens. 2-DE-immunoblotting and the following identification of IgE-binding proteins by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry revealed the presence of novel putative allergens, such as fructosyltransferase, cyclophilin and legumin-like protein. Since their large diffusion in plant kingdom, these proteins may act as pan-allergens inducing cross-sensitization to pollens from different species or fruits and vegetable foods.

Reference

1. Gonzalez-Buitrago JM, Ferreira M, Isidoro-Garcia M, Sanz C, Lorente F, Davila I. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clin Chim Acta* 2007;385(1-2):21-7.

143

IL CONTRIBUTO DELLA COMPONENTE RESOLVED DIAGNOSTIC NEL LABORATORIO DI ALLERGOLOGIA

S. Gabbriellini¹, R. Berni¹, M.R. Metelli¹, P. Pietrini¹

¹U.O. An. Chimico Cliniche Specializzate Universitaria, A.O.U.P., Pisa

Introduzione. Le sindromi allergiche sono affezioni che si manifestano clinicamente con quadri diversi, aventi in comune un meccanismo patogenetico. In soggetti sensibili possono determinare specifiche reazioni immunitarie, umorali e/o cellulari, responsabili delle manifestazioni cliniche. Queste possono essere prodotte da allergeni del tutto diversi e, viceversa, un singolo allergene può produrre, in soggetti differenti, e a volte anche nello stesso soggetto, sintomi clinici diversi.

Studio. Si propone di valutare l'utilità del dosaggio degli allergeni ricombinanti per definire il profilo di sensibilizzazione del paziente, arrivando ad individuare il tipo di proteine a cui è sensibilizzato e quindi migliorarne la gestione clinica.

Pazienti e Metodi. Lo studio ha previsto il dosaggio di IgE specifiche su siero di 3 pazienti. Il metodo utilizzato è l'Immunocap® (Phadia) Specific IgE. È un sistema diagnostico in vitro che misura i livelli ematici delle IgE allergene-specifiche presenti nel siero o nel plasma umano. Il test è strutturato come un immunodosaggio FEIA "sandwich".
Risultati e Discussione. I livelli di IgE specifiche riscontrati nei 3 pazienti presentano una positività abbastanza marcata verso pesca, castagna e mela. Nei primi due casi si evidenzia un'alta positività verso estratti di polline di betulla e nocciolo. Nella maggioranza dei casi, la sindrome orale allergica dei soggetti sensibilizzati al polline degli alberi è causata da cross-reattività tra la molecola Betv1 con le sue proteine omologhe. In entrambi i casi, infatti, si riscontra un'alta concentrazione sierica di IgE specifiche verso la molecola Betv1. Negli ultimi anni la diagnostica delle allergie per mezzo di allergeni ricombinanti sta diventando sempre più affidabile per ottenere esiti più appropriati e profili di sensibilizzazione più accurati, permettendo di inquadrare le allergie come un processo di sensibilizzazione verso un gruppo di allergeni con funzioni biochimiche definite. Riteniamo sia necessario incrementare le casistiche per confermare le importanti aspettative anche in campo terapeutico.

Bibliografia

Soderstrom L et al. A further evaluation of the clinical use of Specific IgE antibody testing in allergic diseases. *Allergy* 2003;58:921-8.

144

VALUTAZIONE DI UN NUOVO TEST PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI GLIADINA: ANTICORPI ANTI PEPTIDI DEAMIDATI DELLA GLIADINA (DGP-AGA)

T. Imbastaro¹, M. Valerio¹, A.M. Marini¹, M.P. Fiorilli¹

¹Lab. Analisi Chim. Clin. e Microbiologia, Osp. Spirito Santo, Pescara

Scopo della ricerca. Fin dagli anni '80 per la diagnosi sierologica della malattia celiaca (MC) è stata utilizzata la ricerca degli anticorpi anti gliadina.

Con il passare degli anni questo tipo di dosaggio ha perso sempre più significato anche grazie all'introduzione nella pratica diagnostica di nuove metodiche più sensibili e specifiche (anticorpi anti transglutaminasi (tTG), anticorpi anti endomisio (EMA)).

Recentemente è stata messa a punto una nuova metodica ELISA che dosa gli ANTICORPI ANTI PEPTIDI DEAMIDATI DELLA GLIADINA (DGP-AGA). Qui l'antigene adesso al pozzetto di microtitolazione, invece di essere alfa gliadina pura, è rappresentato da frammenti di glutine deamidati, situazione più corrispondente a quanto avviene fisiologicamente.

È noto infatti che i frammenti di glutine, una volta attraversata la barriera degli enterociti, entrano in contatto nella lamina propria della mucosa duodenale con la tTG tissutale che ne determina la deamidazione (da glutamina ad acido glutammico).

Materiali e metodi. Sono stati selezionati 88 sieri di pazienti pervenuti al Laboratorio di Autoimmunologia del P.O. di Pescara, in regime di ricovero o ambulatoriale per la diagnosi sierologica del morbo celiaco, risultati negativi alla tTG IgA ed agli EMA IgA, ma non al dosaggio degli AGA tradizionali.

Vista la relativa specificità dei test AGA IgA tradizionali, abbiamo voluto verificare la specificità del nuovo test effettuando sugli stessi sieri il dosaggio degli anticorpi anti peptidi deamidati della gliadina (DGP). A tale scopo è stato impiegato il kit commerciale #Glia-Pep (Eurospital S.p.A. Trieste).

Risultati. Degli 88 campioni di pazienti IgA ed EMA IgA negativi, 87 sono risultati positivi ai DGP IgA e solo 1 positivo, con una specificità del 98,86%.

Conclusioni. I nostri dati concordano con i dati di letteratura sull'utilizzo degli anticorpi anti peptidi deamidati della gliadina (DGP). Visto l'elevato grado di specificità della metodica, si può affermare che possono essere inseriti di buon grado nell'armamentario diagnostico per la diagnosi sierologica di MC al posto degli AGA tradizionali.

Bibliografia

Ankelo M, Kleimola V, Simell S, Simell O, Knip M, Jokisalo E, Tarkia M, Westerlund A, He O, Viander M, Ilonen J, Hinkkanen AE. Antibody responses to deamidated gliadin peptide show high specificity and parallel antibodies to tissue transglutaminase in developing celiac disease. *Clin Exp Immunol* 2007Nov;150(2):285-93.

145

USEFULNESS OF ANTIBODIES TO DEAMIDATED GLIADIN PEPTIDES IN CELIAC DISEASE DIAGNOSIS AND FOLLOW-UPE. Mainardi¹, A. Vagni¹, M. Cazzamalli¹, L. Cresci¹, M.T. Romagnoli¹, M. Cassani¹¹Clinical Pathology Department, AO Ospedale Maggiore di Crema

Introduction. Nowadays the role of anti-gliadin (IgA and IgG) antibody testing (AGA) has been reduced by the identification of anti-transglutaminase (TTG) autoantibodies which was found to be a marker with a very high diagnostic value for celiac disease (CD), so that AGA use is now confined only to very young children where the sero-conversion of TTG is doubtful. Recently has been shown that deamidated gliadin peptides (DGP) are efficient antigens in diagnostic test for CD and results correlate better with TTG than those with native gliadin.

Objective. The aim of the study was to evaluate the performance of DGP measurements in the diagnosis and follow-up evaluation of CD and compared their potential usefulness with that of native gliadin.

Methods. 27 children both before the development of CD and following the institution of a gluten free diet were studied to determinate the performance of DGP and the relationship of this with the native one.

Results. In 27 children enrolled before the development of CD the sensitivity of DGP IgA (74%) and DGP IgG (85%) were superior to AGA IgA (41%) and AGA IgG (81%). In 13 children on gluten free diet with TTG negative, both DGP IgA and AGA IgA were negative, while DGP IgG (15%) antibodies resolved sooner than AGA IgG (77%).

In 2 of our 27 patients, DGP IgA was the only positive marker of CD, infact TTG IgA antibody was still negative.

Conclusion. Measuring DGP antibodies may be more useful than native gliadin in monitoring children on a gluten free diet for the rapid decrease of antibodies moreover DGP antibodies can precede the appearance of TTG IgA in some at risk children.

Reference

Natural history of antibodies to deamidated gliadin peptides and transglutaminase in early childhood celiac disease. *J of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2007;45:293-300.

146

ANTIBODIES AGAINST SYNTHETIC DEAMIDATED GLIADIN PEPTIDES FOR CELIAC DISEASE DIAGNOSIS AND FOLLOW-UP IN CHILDRENA. Stranges¹, D. Basso¹, G. Guariso², P. Fogar³, A. Meneghel², C. Zambon³, F. Navaglia¹, E. Greco¹, S. Schiavon¹, M. Rugge⁴, M. Plebani¹¹Dip. di Medicina di Laboratorio, Az. Osp., Padova²Dip di Pediatria, Az. Osp., Padova³Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Univ. Padova⁴Dip. di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali, Univ. Padova

Background. Diagnostic ELISAs for celiac disease (CD) which uses synthetic deamidated gliadin-derived peptides as antigen (AGA IgA II and AGA IgG II), have recently been suggested as reliable tools for CD diagnosis. We ascertained their utility for diagnosis and monitoring CD in children, comparing the results with those of the well established CD index, anti-tissue transglutaminase (tTG). **Methods.** 121 CD and 125 control children were studied (CD diagnosis histologically confirmed or ruled out). In fasting sera tTG, AGA IgA II and AGA IgG II were measured by ELISAs.

Results. tTG IgA levels were significantly higher in children with CD (161.3 ± 6.5 Units, mean \pm SEM) than in control children (8.7 ± 2.2 Units)(Students' t test: $t=22.7$, $p<0.0001$). The mean values of AGA IgA II and of AGA IgG II in CD children were significantly higher than those of controls for both assays ($t=17.5$, $p<0.0001$ and $t=15.1$, $p<0.0001$ respectively). The under ROC curve areas were: 0.971 ± 0.01 (mean \pm SE) for tTG; 0.938 ± 0.02 for AGA IgA II; 0.964 ± 0.01 for AGA IgG II. The cut-off value, identified on the basis of the best differential positive rate, was 20 Units for all three indices.

The best sensitivity (94.9%), specificity (94.3%), PPV (94.1%) and NPV (95.1%) were obtained by using tTG. AGA IgG II correctly classified 3/3 CD children with total IgA deficiency, which had negative tTG and AGA IgA II results. In children of less than 2 years, the best CD index was AGA IgG II (100% sensitivity and specificity). tTG, AGA IgA and IgG II levels significantly diminished after one year of gluten-free diet, although they reached values below the cut-off in no more than 50% of the cases.

Conclusions. In the absence of total IgA deficiency, the best available index for making a diagnosis of CD in children of more than 2 years, is tTG. In infants of less than 2 years, AGA IgG II is the most reliable serum index of CD, this index is also performing well in cases of total IgA deficiency. Gluten free diet monitoring can be achieved using any of the studied serum indices.

Reference

Liu E, Li M, Emery L, Taki I, Barriga K, et al. Natural history of antibodies to deamidated gliadin peptides and transglutaminase in early childhood celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45:293-300.

147

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO DELLA ARTRITE REUMATOIDE: VALUTAZIONE COMPARATIVA DI MARKERS DELL'INFIAMMAZIONE E DI MARKERS ANTICORPALI

A. Russo¹, M. Friggeri², C. Bonaguri¹, L. Battistelli¹, S. Pipitone¹, R. Aloe¹, R. Perini¹, S. Pedretti¹, F. Bacciottini², M. Cesare¹

¹Lab. Diagnostica Ematochimica, Dip. Patol. e Medicina di Lab., Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

²Dip. Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Parma

Scopo. Negli ultimi anni la diagnostica di laboratorio dell'Artrite Reumatoide (A.R.) ha visto profondi cambiamenti che hanno portato alla individuazione e definizione clinica di markers anticorpali specifici, come il Fattore Reumatoide (FR) e recentemente gli anticorpi anti-Peptidi Ciclici Citrullinati (CCP), che si sono affiancati a marker aspecifici di infiammazione quali la Velocità di Eritrosedimentazione (VES) e il dosaggio della Proteina C Reattiva (PCR).

Scopo di questo studio è stato valutare le distribuzioni dei valori dei tests suddetti in pazienti indagati per sospetto diagnostico di A.R.

Materiali e Metodi. Sono stati inclusi nello studio 252 pazienti (di cui 198 femmine e 54 maschi) i cui sieri sono pervenuti consecutivamente al Laboratorio da Gennaio a Giugno 2008 nell'ambito della diagnostica della A.R.

Tutti i pazienti sono stati valutati per i seguenti parametri: CCP, FR, PCRhs e VES.

I dosaggi di PCR e di FR sono stati eseguiti con metodica nefelometrica (Behring), il test CCP con saggio immunoenzimatico (Euro-diagnostica/Alifax).

Il livello di significatività delle associazione riscontrate è stato valutato con il test "chi" quadrato.

Risultati. I risultati, complessivi e disaggregati per sesso, sono stati esaminati valutando i livelli di concordanza positivi/negativi rispetto al test CCP ritenuto di elezione in termini di sensibilità e specificità.

Nel confronto CCP/VES si è osservata una concordanza totale del 58% (n.s.) con una % di valori concordanti più elevata nei maschi (67%) rispetto alle femmine (55%).

Dal confronto CCP/PCR è risultata una concordanza totale del 65% (p<0.5) con % di concordanza analoghe nei due sessi (66% vs 63%).

Nel confronto CCP/FR la % di concordanza è risultata del 79% (p>0.1) senza differenze significative fra femmine e maschi (rispettivamente 78% vs 81%).

Discussione. I dati da noi rilevati confermano la forte associazione fra CCP e FR (concordanza del 79%) pur evidenziano una % di discordanza significativa che rende auspicabile l'uso combinato dei tests, come riportato nelle recenti linee guida per A.R.

Nell'ambito dei markers di infiammazione, la PCR mostra una associazione più evidente con il saggio CCP (65%) rispetto alla VES (58%) che si conferma essere verosimilmente un marker per A.R. nelle fasi di riacutizzazione.

148

COMPARAZIONE TRA TEST IFA E CLIA NEL DOSAGGIO DEGLI ANA COME SUPPORTO ALLA DIAGNOSI DELLE MALATTIE DEL TESSUTO CONNETTIVO

C. Castiglione¹, G. Ciantra¹, D. Ridolfi¹, I. Ruffini¹, E. Tresca¹

¹Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, P.O. "S. Massimo", Penne (PE)

Introduzione. Da più di 50 anni in Laboratorio sono utilizzati test che consentono di evidenziare la presenza di anticorpi organo e non organo-specifici. Il progresso delle conoscenze sulla natura degli autoanticorpi, la tipizzazione dei principali autoantigeni ed il crescente significato diagnostico e prognostico della loro eventuale presenza nel siero di soggetti affetti da malattie autoimmuni, ha fatto sì che negli anni, si sia assistito ad un continuo incremento delle richieste concernenti tali test.

Scopo. Si è voluto comparare la tecnologia CLIA alla tecnica IFA su Hep-2, già in uso nel nostro Laboratorio, per arrivare ad ottenere un'ottimale gestione dei tempi e della qualità delle risposte.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati 270 sieri. La ricerca degli anticorpi anti nucleo è stata eseguita con metodica IFA su Hep-2 (BIORAD) (titolo di screening 1:80), sugli stessi sieri è stata eseguita la ricerca degli autoanticorpi anti nucleo con metodica CLIA i cui risultati sono espressi con valore index.

Valore index < 1.5 = negativo

Valore index > 1.5 = positivo

Risultati. In IFA 223/270 sieri sono risultati negativi mentre 47 sieri sono risultati positivi a vario titolo. Con la metodica CLIA abbiamo ottenuto il 13% di risultati positivi e l'87% di risultati negativi. Sono risultati negativi al test CLIA i campioni con bassi livelli autoanticorpali che possono essere riscontrati in soggetti sani.

Conclusioni. Utilizzando il test Hep-2 per lo screening degli ANA, vengono rilevati anche autoanticorpi senza significato clinico rilevante.

Da quanto sopra, si evince dalla ns. esperienza, che il test CLIA, essendo più specifico e con un più elevato NPV, risulta essere il test più idoneo per uno screening di primo livello delle MAIS.

Bibliografia

1. Tozzoli R et al. Riv Med Lab-JLM 2004;5(1).

2. Tozzoli R, Bizzarro N. La diagnostica di Labor. delle malattie autoimmuni sistemiche. Piccin '98.

149

COMPARISON OF TWO ASSAYS FOR SERUM HOMOCYSTEINE MEASUREMENTC. Bellia¹, G. Bivona¹, D. Butera², M. Fazzari², M. Ciaccio¹¹*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo*²*Dip. Farmacochimico, Tossicologico e Biologico, Università degli Studi di Palermo*

Hyperhomocysteinemia (Hcy) is an established risk factor for vascular disease and it has been observed in patients with neurodegenerative disease (1). Clinical use of homocysteinemia is still controversial, also for the heterogeneity of analytical procedures that make difficult to compare different studies and to establish a reference range. Our study was conducted to compare a fully automated assay (Axsym Abbott fluorescent polarization immunoassay – FPIA) and one established HPLC assay as a reference method.

Serum samples from 33 amyotrophic lateral sclerosis patients were analyzed with both methods on the same day or stored at -20°C. Both FPIA and HPLC assays were calibrated with S-adenosyl-L-homocysteine. HPLC analysis was conducted according to Hyland et al. (2); briefly, sulphur aminoacid were derivatized with o-phthaldialdehyde; HPLC isocratic separation was followed by fluorescence detection. All statistical calculations were performed using SPSS software.

FPIA assay precision studies were conducted analyzing three levels quality controls (7, 12.5 and 25 µmol/L) of L-homocysteine in processed human serum in 4 replicates; in particular, inter-run CV% over 10 days were 6.4%, 7.0% and 3.9%, respectively. For HPLC assay, imprecision data (CV%) were obtained analyzing nine clinical samples in 3 replicates; the intra-run CV% was always <3.3 %. For FPIA data set median value was 16.35 (25th - 75th percentile: 13.26 - 19.67); for HPLC data set median value was 16.35 (25th - 75th percentile: 10.42 - 14.98). Linear regression analysis yielded the following equation: for the expected FPIA assay value (y) is = 0.627 HPLC assay value (x) + 3.102 (R 0.71; p<0.001).

There was a tendency for FPIA assay to give higher homocysteine values than HPLC: median value for FPIA data is 23% higher than HPLC data one. Differences between the two methods are likely due to cross-reactivity with other metabolites such as S-adenosyl-methionine and the monoclonal antibody used in this assay. The linear regression analysis has shown a positive relationship between the two continuous variables. Overall, results from both methods are comparable.

References

1. Zoccolella S, Simone IL, Lamberti P, et al. *Neurology* 2008;70:222-225.
2. Hyland K, Bottiglieri T. *J Chromatogr* 1992;579:55-62.

150

RELAZIONE TRA LE CITOCINE MAGGIORMENTE ESPRESSE NEL MORBO DI CROHN E I VARI PARAMETRI INFIAMMATORI CHE ACCOMPAGNANO LA MALATTIAP. Hoxha¹, F. Favaro¹, F. Navaglia¹, G. Rocco¹, D. Faggian¹, M. Plebani¹¹*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova*

Gli anticorpi anti TNF-α sono spesso usati come terapia nel Morbo di Crohn (M.C), ma non sempre è un trattamento efficace in tutti i pazienti. Studi recenti stanno cercando di mettere in luce il ruolo di altre citochine come IL-6, IL-1β, IL-12 e TGF-β nella malattia infiammatoria dell'intestino. Scopo: Determinare il profilo di espressione delle citochine su indicate nella mucosa rettale di pazienti affetti da M.C e definire la relazione esistente tra profilo di citochine, parametri infiammatori e terapia efficace. Pazienti e metodi: 17 pazienti affetti da M.C con danno della mucosa perianale, 7 pazienti affetti da M.C senza danno della mucosa perianale e 17 controlli sani sono stati arruolati nello studio che prevedeva esami ematici e indagini endoscopiche. Durante l'endoscopia sono stati prelevati 2 prelievi di mucosa rettale su cui è stata condotta l'analisi per la determinazione delle citochine. IL-1β e IL-6, sono state misurate con metodo E.L.I.S.A, utilizzando l'analizzatore Immulite One (Diagnostic Products Corporation, DPC, Los Angeles California, USA) mentre per l'IL-12 e TGF-β è stata utilizzata la tecnica E.L.I.S.A manuale su micropiastra (Bender MedSystem, Vienna, Austria). Il livello delle citochine è stato correlato e confrontato con la diagnosi, la terapia e con altri indici di infiammazione della malattia. Risultati. I livelli di IL-1β e IL-6, misurate sia su biopsia rettale che su siero, sono elevati nei pazienti affetti da M.C con danno perianale rispetto ai pazienti senza danno e ai controlli sani. Inoltre le loro concentrazioni correlano in modo significativo con gli indici infiammatori della malattia e con il danno istologico. IL-12 e TGF-β non mostrano differenze nei 3 gruppi.

Conclusioni. Dove gli anticorpi anti-TNF-α falliscono, IL-1β e IL-6 potrebbero rappresentare un target alternativo della terapia immunomodulatoria.

Bibliografia

1. Ruffolo C, Scarpa M, Faggian D, Romanato G, De Pellegrin A, Filosa T, Prando D, Polese L, Scopelliti M, Pilon F, Ossi E, Frego M, D'Amico DF, Angriman I. Cytokine network in chronic perianal Crohn's disease and indeterminate colitis after colectomy. *J Gastrointest Surg* 2007;11:16-21.

151

UTILIZZO DELLA "COMPONENT RESOLVED DIAGNOSIS" IN PAZIENTI SENSIBILI AL POLLINE DI BETULLAP. Hoxha¹, D. Rinaldi¹, A. Tasinato¹, F. Borghesan¹, D. Faggian¹, M. Plebani¹¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova

Premessa. Gli allergeni derivati da estratti di polline contengono proteine allergeniche specifiche della specie pollinica, panallergeni vegetali e determinanti carboidratici cross reattivi. L'uso delle molecole allergeniche "component resolved diagnosis" permette di definire il vero spettro di sensibilizzazione del paziente, identificando a quale o quali determinanti allergenici è sensibile. Nel caso della betulla sono ora disponibili in Italia tre determinanti allergenici ricombinanti, il t215, il t216, il t220. Materiali e metodi. Su 103 sieri di pazienti abbiamo eseguito oltre al dosaggio delle IgE specifiche nei confronti del t3 (betulla) il dosaggio dei 3 allergeni ricombinanti della betulla (t215,t216,t220) con metodo CAP-PHADIA. Il t215 è l'allergene proprio delle betullacee (BetV1) e identifica i pazienti veramente sensibili a questa specie pollinica, il t216 identifica il panallergene vegetale profilina presente con alto grado di omologia in tutte le specie vegetali, il t220 identifica una proteina legante il calcio cross-reattiva con molte specie vegetali.

Risultati. Sono stati esaminati i sieri provenienti da 103 pazienti (età 3-70 anni, età media 29 anni) (43 donne, 60 maschi). Di questi 75 erano positivi per t215, 30 erano positivi per il t216, 19 per il t220. Ventidue presentavano IgE sia nei confronti del t215 che del t216 e 11 erano sensibili a t215 e t220 con assenza di IgE nei confronti del t216.

Conclusioni. Dei pazienti con IgE per l'allergene derivato dall'estratto di betulla, solo 75 avevano sensibilità nei confronti dell'allergene BetV1 specie-specifico della famiglia delle betullacee e ben 28 erano sensibilizzati nei confronti di panallergeni pollinici. Questi pazienti utilizzando il solo estratto sarebbero stati erroneamente definiti come allergici alle betulle con il rischio di impostare una immunoterapia errata. I vantaggi della diagnostica con allergeni ricombinanti ripagano altamente il maggior costo della determinazione degli allergeni.

Bibliografia

1. Valenta R. Recombinant allergen-based concepts for diagnosis and therapy of type I allergy. *Allergy* 2002;57(suppl.71):66.

152

CORRELAZIONE TRA I LIVELLI DI OMOCISTEINA E DI VITAMINA B12 ATTIVA (HOLO-TC)S.A. Pizza¹, C. Oricchio², C. Della Pepa¹¹Laboratorio Analisi, Osp. Civile di Agropoli (SA)²Unità Raccolta Sangue, Osp. Civile di Agropoli (SA)

Obiettivi. Livelli elevati di omocisteina (Hcy), aminoacido derivato dalla metionina, sono un fattore di rischio per diverse patologie cardiovascolari. L'Hcy è più elevata nei maschi e aumenta con l'età; poco è noto sulla correlazione tra omocisteina e vitamina B12, il cui stato carenziale è rilevante soprattutto nei soggetti anziani. La base biochimica di questa relazione è legata al fatto che l'omocisteina si può riconvertire in metionina tramite due meccanismi, uno dei quali (mediante metionina-sintetasi) è legato ai livelli di vitamina B12. Abbiamo quindi inteso valutare la possibile correlazione tra Hcy e frazione attiva della vitamina B12 (olotranscobalamina, HoloTC), miglior indice di uno stato carenziale rispetto alla vitamina B12 totale¹.

Metodi. Lo studio è stato effettuato su campioni ottenuti da soggetti ambulatoriali afferenti alla nostra struttura con richiesta di determinazione di Hcy, sui quali sono stati analizzati anche i livelli di HoloTC. Entrambe le analisi sono state effettuate con test automatizzati su analizzatore Abbott AxSYM. Il confronto tra i due parametri è stato sia quantitativo (correlazione) che qualitativo; per quest'ultima analisi sono stati considerati nella norma i livelli di Hcy <15 umol/L ed i livelli di HoloTC >37 pmol/L.

Risultati. Sono stati studiati 174 soggetti (45 femmine, 129 maschi; età media 41,0+10,1 anni, range 19-62). I livelli medi di Hcy erano 15,6+8,8 umol/L, lievemente superiori nei maschi (16,1 vs. 14,2; p= n.s.), senza correlazione con i livelli di HoloTC (r2 = 0,048). Il 33,9% dei soggetti aveva Hcy elevata (maschi: 37,2%; femmine: 24,4%), senza correlazione con l'età. Livelli bassi di HoloTC erano presenti in 49 soggetti (28,2%; 20,9% nei soggetti con Hcy normale, 41,3% in quelli con Hcy elevata; p <0,01). I livelli medi di HoloTC erano significativamente inferiori nei soggetti con Hcy elevata (42,6+17,7 contro 55,9+24,1; p <0,05).

Discussione. Pur in assenza di correlazione tra Hcy e HoloTC, l'associazione tra livelli incrementati o elevati di Hcy e stato carenziale di B12 è risultata abbastanza evidente. Appare opportuno determinare entrambi i parametri per un migliore inquadramento metabolico.

Bibliografia

1. Brady J, Wilson L, McGregor L, Valente E, Orning L. *Clinical Chemistry* 2008;54(3):567-73.

153

LIVELLI DI OMOCISTEINA IN PAZIENTI TRATTATI CON ANTICOAGULANTI ORALI E IN ALTRE PATOLOGIE CARDIOVASCOLARI

S.A. Pizza¹, C. Oricchio², C. Della Pepa¹¹Laboratorio Analisi, Osp. Civile di Agropoli (SA)²Unità Raccolta Sangue, Osp. Civile di Agropoli (SA)

Obiettivi. L'omocisteina (Hcy) è un aminoacido derivato dalla metionina il cui incremento in circolo è correlato con lo sviluppo di diverse patologie cardiovascolari. Abbiamo valutato i livelli di omocisteina in un campione rappresentativo di pazienti ambulatoriali con varie patologie e in terapia con anticoagulanti orali.

Metodi. Lo studio è stato effettuato su campioni di plasma ottenuti da 172 pazienti afferenti al nostro Centro. La concentrazione di Hcy è stata determinata con metodo FPIA (Abbott AxSYM) e posta in relazione con parametri demografici e clinici e con la durata della terapia anticoagulante. I livelli di Hcy sono stati considerati normali (NI) <15 umol/L, incrementati (I) >15 ed elevati (E) >30.

Risultati. I pazienti (70 femmine e 86 maschi) avevano un'età media di 70,8±11,3 anni (mediana: 73; range: 29-89), analoga per i due sessi. La patologia più frequente era la fibrillazione atriale, da sola o in associazione con altre malattie (88 pazienti, 47,4%); seguivano le valvulopatie (31 soggetti, 19,9%), le sindromi tromboemboliche periferiche (10 soggetti, 6,4%), le patologie vascolari cerebrali (9 soggetti, 5,8%) e la patologia miocardica ischemica (8 soggetti, 5,1%). Per le elaborazioni sono stati considerati i primi due gruppi e le altre patologie insieme. I livelli medi di Hcy erano 15,27±5,83 umol/L, più elevati nei maschi e con incremento per età. Valori I od E erano presenti nel 40,7% e nel 3,5% dei casi e più frequenti nei maschi (44,9% contro 35,1% e 6,1% contro 0). Non vi erano differenze significative tra gruppi di patologie, ma vi era una relazione diretta tra livelli di Hcy e durata della terapia anticoagulante (livelli medi e frequenza I <6 mesi: 15,70±5,45 e 52,4%; >24 mesi 12,45±4,65 e 11,1%).

Discussione. Lo studio ha confermato l'elevata frequenza di valori incrementati o francamente patologici di Hcy nei soggetti di età avanzata¹, pur non potendone stabilire il ruolo causale o concausale per lo sviluppo delle patologie osservate. I dati ottenuti indicano che è utile determinare Hcy nei pazienti affetti da patologie cardiovascolari al fine di adottare strategie atte a ridurre il rischio di ulteriori complicanze.

Bibliografia

1. Dangour AD, Breeze E, Clarke R, Shetty PS, Uauy R, Fletcher AE. *J Nutr* 2008;138:1121-8.

154

COMPARISON BETWEEN ANALYTICAL PERFORMANCE OF POLYCLONAL AND MONOCLONAL ELECTROCHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAYS FOR NT-proBNP

C. Prontera¹, G.C. Zucchelli¹, S. Vittorini¹, S. Storti¹, S. Turchi¹, M. Emdin¹, A. Clerico²¹Foundation Gabriele Monasterio - CNR, Institute of Clinical Physiology of Pisa²Scuola Superiore S. Anna, Pisa

Background. We evaluated the analytical characteristics of electrochemiluminescence (ECLIA) immunoassay for NT-proBNP (proBNP II, Roche Diagnostics, Germany) and compared its analytical performance to that of the previous polyclonal method.

Methods. We measured NT-proBNP in EDTA plasma samples of 177 consecutive cardiac patients (69 females and 108 males; mean age 62.2 ± 16.4 years, range 13-96 years) with monoclonal and polyclonal ECLIA methods following manufacturer's instructions using an Elecsys® 2010 analyzer.

Results. Monoclonal ECLIA method for NT-proBNP assay showed an imprecision (CV%) lower than 3% at the cut-off value (i.e., 150 ng/L). No significant interference was found in plasma samples containing high levels of hemoglobin, triglyceride or bilirubin. EDTA plasma showed slightly lower NT-proBNP values than serum and lithium-heparinized plasma samples (on average 6.3% and 4.4% respectively). Finally, a very close linear regression was found between the NT-proBNP values found by either monoclonal or polyclonal ECLIA method (polyclonal ECLIA= 93.7+ 0.948 monoclonal ECLIA, n= 177, R= 0.993).

Conclusions. The monoclonal ECLIA method showed very similar analytical characteristics with slightly lower NT-proBNP results (on average 5.3%) than the polyclonal ECLIA method. This difference seems to be too slight to change the reference range and decisional values for NT-proBNP assay measured by ECLIA method.

155

MARCATORI TUMORALI, VARIABILITÀ BIOLOGICA E TRAGUARDI ANALITICI

S. Scella¹

¹S.C. Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera C.T.O., Maria Adelaide, Torino

Scopo. Valutare il raggiungimento dei traguardi analitici, calcolati sulla base della variabilità biologica, imprecisione (CV%), bias (B%) ed errore analitico totale (TE%) di alcuni dei marcatori tumorali (AFP, FERRITINA, CEA, PSA) eseguiti sul sistema TOSOH AIA 1800. Comparare i valori sperimentali di variabilità analitica con lo "stato dell'arte". Materiali e metodi. Sieri per controllo di qualità interno Tosoh Multi-Analyte Control a tre livelli di concentrazione eseguiti alternativamente in ogni seduta analitica per lungo periodo (circa 100 dati per livello). Dati riepilogativi del programma Internazionale di VEQ EQAS – CNR concernenti il periodo di studio (anno 2007). Reattivi ST-AIA-PACK test immunoenzimatico eseguito sul sistema AIA 1800. Calcolo dei valori sperimentali di CV%, B%, TE% e confronto con le specifiche di qualità stratificate in minime, desiderabili e ottimali come suggerito da Fraser.

Risultati

CV% analitico AFP: 2.72%; FERRITINA: 4.64%; CEA:2.64%; PSA: 3.78%, B% analitico AFP:0.00%; FERRITINA: 1.60%;CEA: 1.60%; PSA: 0.00%,TE% analitico AFP:4.49%; FERRITINA: 9.25%; CEA:5.96%; PSA: 6.24%, CV %desiderabile AFP: 6.00%; FERRITINA:7.50%; CEA: 6.40%; PSA: 9.10%, B% desiderabile AFP: 11.9%; FERRITINA: 5.00%; CEA:14.30%; PSA:18.7%,TE% desiderabile AFP:12.8%; FERRITINA: 17.30%; CEA:24.70%; PSA: 33.6%, CV%stato arte AFP:9.00%; FERRITINA: 8.00%; CEA: 8.00%; PSA:8.00%

Conclusioni. Il traguardo analitico è ampiamente raggiunto per tutti i parametri presi in considerazione raggiungendo e superando le soglie ottimali per AFP, CEA, PSA e appena al di sotto per la FERRITINA. Anche i limiti imposti dai CV definiti dallo <<stato dell'arte>> della VEQ sono ampiamente rispettati.

Bibliografia

1. Mercuri A, Chiesa MR, Conte R, Giovannini S, Zucchelli GC, Pilo A. Variabilità "Stato dell'arte" dei saggi immunometrici: dati dei programmi EQAS-CNR 2007.
2. Fraser CG. Biological variation from principles to practice. Biomedica Source Books, 2004 (Ed. Ital.)

156

APPLICAZIONE DELLE LINEE GUIDA SULLA TIROIDE

M. Tura¹, M. Filocamo¹, S. Szymczuk¹

¹Servizio di Medicina di Laboratorio Ospedale Infermi Rimini, Italy

L'approccio diagnostico per la richiesta dei parametri tiroidei (TSH, FT4 e FT3) deve seguire algoritmi razionali per evitare sia informazioni fuorvianti che sprechi economici. In un sospetto di disfunzione o malattia della tiroide, secondo le linee guida, il primo test raccomandato è la determinazione del TSH; se basso o alto è necessario combinare il dosaggio di FT4; il dosaggio di FT3 va riservato ai soli casi di forte sospetto di ipertiroidismo o situazioni cliniche rare nei quali la FT4 sia risultata normale. In accordo con i clinici del nostro nosocomio e con le linee guida sulla tiroide, da circa 6 mesi è stato attivato questo protocollo: ai pazienti ricoverati con sospette patologie tiroidee viene eseguita in prima battuta il dosaggio di TSH e, in presenza di un valore alterato (<0.20 o >4.0), viene implementato automaticamente con un dosaggio reflex la frazione libera FT4. In presenza di TSH basso (<0.20) e FT4 normale (8.0 – 18.0) si ravvisa la necessità di un ulteriore dosaggio di FT3 per diagnosticare una eventuale tireotossicosi da FT3. L'attuale organizzazione del nostro laboratorio non è in grado di implementare automaticamente questo secondo test reflex ma lascia al Dirigente laureato, che valuta in tempo reale, il compito di aggiungere manualmente il dosaggio di FT3 nei casi selezionati, utilizzando lo stesso prelievo. Sono stati valutati il numero di tests effettuati nel semestre di adeguamento alle linee guida e nel semestre precedente: a fronte di un numero di richieste interne quasi identico (circa 6300) l'adeguamento alle linee guida ha determinato una riduzione del numero di FT4 eseguiti del 51% e per l'FT3 ben l'80% in meno. Le linee guida, anche se non possono prescindere dall'approccio clinico al paziente e dall'eventuale supporto endocrinologico, essendo frutto di esperienze specialistiche e di letteratura internazionale, sono estremamente utili per razionalizzare la domanda dei tests di funzionalità tiroidea, produrre un dato utile al clinico e contenere i costi.

Bibliografia

Linee guida per la diagnostica di laboratorio della funzione tiroidea, Azienda Ospedaliera, Università di Padova, Azienda ULSS 16.

157

PLASMA LEVELS OF HIGH MOLECULAR WEIGHT ADIPONECTIN IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC DILATED CARDIOMYOPATHYC. Caselli², M. Maltinti¹, S. Del Ry¹, C. Prontera¹, D. Neglia¹, D. Giannessi¹¹CNR Institute of Clinical Physiology, Fondazione G. Monasterio, Pisa, Italy²Scuola Superiore S. Anna, Pisa, Italy

Purpose. Adiponectin is considered as a new diagnostic/prognostic marker in the cardiovascular disease. The low-(LMW), the middle-(MMW) and the high-molecular weight (HMW) isoforms have been found in human peripheral circulation. HMW, the active form, has cardioprotective effects and its determination could give additional information on the role of this protein in cardiovascular diseases. Aim of the study was to determine the levels of adiponectin multimers in patients with dilated cardiomyopathy (DCM) and to evaluate its relationship with inflammatory profile and left ventricular (LV) function.

Methods. Plasma levels of total (T) adiponectin and its multimers were evaluated in 50 no diabetic patients with DCM (30 males, 38 in NYHA class I-II, 12 in NYHA class III, LVEF% 40.6 ± 1.4 , age 57 ± 1 yrs, BMI 26.6 ± 0.41 , mean \pm sem) and in 25 age- and BMI-matched healthy subject as controls by an ELISA method (Alpo Diagnostics, US).

Results. T adiponectin in DCM increased with respect to controls (3.8 ± 0.38 mg/ml vs 5.4 ± 0.48 in NYHA class I-II vs 8.0 ± 1.9 in NYHA class III; $p < 0.05$ NYHA III vs controls and NYHA I-II) and correlated with functional and inflammatory indices. HMW represented the 50% of T adiponectin to which was positively correlated ($p < 0.001$). HMW significantly increased in DCM with respect to controls (1.8 ± 0.15 mg/ml vs 2.5 ± 0.21 in NYHA class I-II vs 4.8 ± 1.2 in NYHA class III; $p < 0.001$ NYHA class III vs controls and NYHA class I-II), while MMW and LMW did not vary. HMW correlated negatively with LVEF% ($p = 0.0041$), positively with Interleukin-6 ($p < 0.001$) and BNP ($p = 0.003$). No significant correlation with BMI was observed both for T and HMW adiponectin.

Conclusions. HMW adiponectin increases significantly as a function of severity in DCM patients. The significant relation of HMW forms with markers of inflammation and cardiac dysfunction, lacking for MMW and LMW forms, underlines the importance to investigate the role of HMW in this disease.

Reference

Tsutamoto T, Tanaka T, Sakai H, Ishikawa C, Fujii M, Yamamoto T, Horie M. Total and high-molecular weight adiponectin, haemodynamics and mortality in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2007;28:1723-30.

158

SEARCHING FOR BETTER IRMA (IMMUNORADIOMETRIC ASSAY) CALIBRATION CURVE MODELSS. Ferraro¹, L. Ciardi², C. Vendramin², G. Antonini², G. Tomassini², M. Graziano², L. Miglio², M. Maineri², E. Saliva², G. Bellomo², E. Biganzoli³¹SCDO Cardiologia 2, AOU Maggiore della Carità, Novara²SCDU Laboratorio Ricerche Chimico Cliniche, AOU Maggiore della Carità, Novara³Istituto di Statistica Medica e Biometria, Università degli Studi di Milano

Aim. The CGA-RIACT (IRMA,CIS-BIO) method recommend to build up standard curve by linear interpolation of activity of standard tubes versus fixed standard concentrations, fitting a linear regression curve model. The estimation of straight line model parameters, by ordinary least squares method(OLS), implies assumptions about the variability of the responses from calibration tubes, that are affected by errors: the independence, the constant variance, the normal distribution of errors around the regression. Study aim was to check the adequacy of linear interpolation to build up calibration curve, verifying that responses were consistent with the assumptions.

Methods. We selected 30 calibration curves from 4 different batches. Standard tubes were performed in replicates. We build up the dose-response calibration curves by a linear regression model through OLS.

Results. For all curves from different batches most of the patterns of the observed standard responses showed overlapping shapes. We had no evidence that calibration line could fit the mean points of the responses, derived from two replicates of the standard tubes. The variability of calibration responses do not represent random error because the pattern of departure from the fitted regression straight line is systematically reproduced in all calibrations runs from all batches. We had evidence that the variance of the replicated calibration responses is not uniform but increases as the standard concentrations. These profiles for every batch assumed a particular plot form assessing heteroscedasticity in the residuals suggesting the need for extra terms in the model. Consequently all tests performed in analysis of variance and Confidence Interval(CI) calculation for the calibration curve are invalidated.

Conclusions. We have evaluated that the straight line regression model was inadequate to fit calibration curve. The violation of assumptions for linear regression invalidated the point and interval estimation of calibration curve. There are no minimal requirements neither to check the performances of the test such as accuracy, precision, analytical sensitivity nor to evaluate CI for sample unknown values.

Reference

Raab GM, Estimation of a variance function, with application to immunoassay *Appl Stat* 1981;3:32-40.

159

PRELIMINARY EVALUATION OF A NEW CYSTATIN C ASSAY ON THE ABBOTT ARCHITECT cSYSTEMS AND AEROSET CLINICAL CHEMISTRY SYSTEMSR. Lucini¹, F. Rota¹, L. De Angelis¹, R. Dioli¹, M. Fritz², H. Troonen²¹Sentinel CH., Milan, Italy²Abbott GmbH & Co. KG, Diagnostics, Delkenheim, Germany

Objective. A new Cystatin C assay was evaluated on the ABBOTT ARCHITECT cSystems and AEROSET Clinical Chemistry Systems. Scope of the study was to verify analytical performance and agreement with the NACB's guidelines for Emerging Biomarkers of Cardiovascular Disease and Stroke with a total analytical error 15%.

Materials/Instruments. The new Cystatin C assay, SENTINEL CH., is an immunoturbidimetric assay, based on microparticles coated with anti-hu CysC (rabbit). The assay was designed to correlate with PENIA Cystatin C. Abbott's ARCHITECT cSystems and AEROSET Systems are random-access clinical chemistry analyzers. ARCHITECT cSystems can be integrated with ARCHITECT i2000SR, an immunoassay module, to form the ci8200 or ci16200.

Study Design. Performances were investigated using modified CLSI protocols. Acceptance criteria were less than 5% CV for total imprecision, less than 5% bias for accuracy and Total Error less than 13.2%. Method comparison was performed by comparing ARCHITECT and/or AEROSET results with those generated by PETIA I on Hit. 912, PETIA II on AEROSET and PENIA on BNA.

Results. Total imprecision (10 days) gave CV% not higher than 4.5%. LOD on both instruments and LOQ on Architect c8000 were lower than 0.04 mg/L. Linearity was up to 8 mg/L. No prozone up to 25 mg/L. On board calibration stability was 30 days. Bilirubin 66 mg/dL, Hemoglobin (1000 mg/dL), Triglycerides (1000 mg/dL) did not interfere.

Comparison (n=80):

Aeraset vs PETIAI: slope 1.19, intercept -0.13, r 0.98

Aeraset vs PETIA II: slope 0.97, intercept 0.04, r 1.00

Aeraset vs PENIA: slope 1.00, intercept 0.11, r 0.99

c8000 vs Aeraset: slope 1.02, intercept -0.03, r 1.00

Conclusion. Performance of the new SENTINEL Cystatin C assay on Abbott clinical chemistry systems fully meets the NACB's guidelines for Cystatin C measurement on both ABBOTT systems.

The excellent correlation with nephelometric method is in accordance with the IFCC efforts on standardization of Cystatin C.

160

DOSAGGIO DEL COLESTEROLO LDL: CONFRONTO TRA RISULTATI DI UNA METODICA OMOGENEA CON LA STIMA OTTENUTA MEDIANTE FORMULA DI FRIEDEWALDL. Caponi¹, P. Pietrini¹¹U.O. Laboratorio di Analisi Cliniche Specializzate, Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Biologia Molecolare, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Pisa

Tra i parametri di laboratorio utili per la stima del rischio cardiovascolare, particolare importanza riveste la misura del colesterolo LDL (LDL-C), considerato anche il principale target per la terapia ipolipemizzante. Fino a poco tempo fa, l'LDL-C era calcolato con la Formula di Friedewald (FF), poichè le metodiche di dosaggio non erano facilmente automatizzabili e non erano ritenute abbastanza specifiche. Negli ultimi anni sono state approntate diverse metodiche dirette. I primi confronti tra metodiche omogenee, FF e metodo di riferimento pur accertando la buona riproducibilità dei risultati, non sono stati concordi sulla specificità delle metodiche, rimandando alla necessità di ulteriori studi (Nauck M, et Al. Clin Chem. 2002;48:236-54). Abbiamo pertanto deciso di confrontare i risultati del LDL-C ottenuti mediante dosaggio con la metodica diretta adottata nel nostro laboratorio (Roche Diagnostic) e LDL-C calcolato con la FF.

Sono stati selezionati 361 campioni di soggetti afferenti al nostro laboratorio (132 uomini e 229 donne), per i quali era stata richiesta la determinazione dell'LDL-C, e degli esami necessari a stimare anche il dato calcolato.

I risultati del nostro studio possono essere riassunti come segue: i valori del LDL-C dosato e calcolato, hanno mostrato tra loro una buona corrispondenza (regressione $Y = 9503x + 20,17$). Le medie però sono risultate tra loro significativamente diverse ($p < 0,0001$). Il confronto dei due metodi secondo Bland-Altman ha dimostrato una moderata sovrastima dell'LDL-C dosato direttamente sull'LDL-C calcolato (bias = 13,7 mg/dl).

I campioni sono stati quindi suddivisi in due gruppi secondo la quantità di trigliceridi (TG) in essi contenuta (maggiore o minore di 200 mg/dl) dal momento che è noto che la performance della FF è peggiore per livelli maggiori di TG. Le analisi sul sottogruppo con TG più bassi erano sostanzialmente sovrapponibili a quelle riferite all'intero campione, mentre il bias tra i risultati sui campioni con TG più elevati risultava leggermente maggiore (20,6 mg/dl).

In conclusione i nostri dati sembrano dimostrare una generale sovrastima dei livelli di LDL-C dosati su quelli calcolati secondo la FF. Tale differenza è leggermente più pronunciata tra i campioni contenenti maggiori livelli di TG.

161

AN ANALYSIS COMPARING THE LDL DIRECT ASSAY WITH THE FRIEDEWALD CALCULATIONA. Ruggeri¹, P. Casprini¹, M.S. Camiciottoli¹, A. Celli¹¹Lab. Analisi Chimico Cliniche, Osp. Misericordia e Dolce, Prato

Introduction. Increased low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) is an established risk factor for the development of coronary artery disease. Recent guidelines detail specific LDL-C cutpoints for therapeutic goals. In practice, LDL-C is usually derived from the Friedewald formula (FF) and this calculation is known to be inaccurate with serum triglyceride (TG) concentrations 400 mg/dL (>4.52 mmol/l) (1).

An analysis of problems with the calculated LDL-C values suggests that the homogeneous direct methods is preferred (2).

Methods. Serum concentrations of total cholesterol (TC), TG, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and LDL-C were measured with Beckman Coulter reagents. This direct LDL Cholesterol method is a homogeneous assay without the need for any off-line pretreatment or centrifugation steps. The method depends on a unique detergent which solubilizes only the non-LDL lipoprotein particles and releases cholesterol to react with cholesterol esterase and cholesterol oxidase to produce a non-color forming reaction. A second detergent solubilizes the remaining LDL particles, and a chromogenic coupler allows for color formation. LDLD reagent is used to measure the cholesterol concentration by a timed-endpoint method.

Results and Conclusions. Lipoprotein data from about 5000 subjects, covering a wide range of total plasma cholesterol levels, were used to examine the validity of the low density lipoprotein (LDL) evaluated from a direct measurement of LDL-D. Values of LDL-D were compared with values of LDL derived from FF for estimating serum concentrations of LDL-C using high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) concentrations.

Despite the good correlation between LDL-D and LDL-C a levelling (flattening) of the curve of regression is observed when it takes in examination the values of LDL understood among 100 and 140 mg/dL, that it represents the decisional cut-off for the cardiovascular risk. In particular, in the LDL ranges (100-140mg/dL) values, the homogeneous direct methods is preferred, however in our laboratory it exists a managerial system (Labitup) that for every dosing of LDL, verification the agreement between LDL-C and LDL-D, signalling us the principal discordances.

References

1. Tighe DA, Ockene IS, Reed G, Nicolosi R. Clin Chim Acta 2006;365(1-2):236-42.
2. Aufenanger J, Zawta B. Clin Lab 1999;45:617-62.

162

FACTORS AFFECTING S-HOMOCYSTEINYLATION OF LDL APOPROTEIN BA. Zinellu¹, S. Sotgia¹, E. Pisanu¹, B. Scanu¹, M.Sanna¹, S. Pasella¹, A. Baralla¹, L. Musino¹, L.Deiana¹, C. Carru¹¹Departement of Biomedical Sciences, Chair of Clinical Biochemistry, University of Sassari

Hyperhomocysteinemia is an important risk factor for vascular disease and atherosclerosis. The mechanisms by which homocysteine exerts its deleterious effects are still unclear even if oxidation and/or homocysteinylation could increase atherogenicity of LDL. We evaluate the most important factors affecting S-homocysteinylation of LDL by measuring LDL bound thiols (homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, glutamylcysteine) from 104 healthy subjects by capillary electrophoresis. Total plasma thiols levels and lipid profile were also assessed. Our data suggest that ApoB-CysGly, -Hcy and -Cys levels are significantly higher in males than in females. The distribution of CysGly on ApoB is higher than that of the same thiol in plasma and also GSH is more represented in the LDL fraction than in plasma. On the contrary the other thiols are significantly less represented in lipoprotein than in plasma. The evaluation of the concentration of plasma thiols bound to LDL for all subjects and after subdivision for sex suggests that in a litre of plasma 0.522 μ mol of thiols are bound to LDL that is the 0.193% of total plasma thiols. The concentration of ApoB-bound Hcy is significantly lower in females than in males (0.0136 vs 0.0184 μ mol/L, $p < 0.01$). Pearson's correlation shows that among all thiols only total plasma Hcy is related to apoB-Hcy levels ($p < 0.0001$). Multiple correlation analysis have confirmed that total Hcy is the most important determinant of ApoB-Hcy (t-test=7.98, $p < 0.0001$) but also a positive relationship with LDL (t-test=2.1, $p < 0.05$) and sex (t-test=3.41, $p < 0.001$) was found, while Cys (t-test=-1.99, $p < 0.05$) and mainly CysGly (t-test=-4.00, $p < 0.001$) were negatively related with ApoB-Hcy levels.

In conclusion, the extent of ApoB-Hcy derivative formation is mainly dependent on total homocysteine concentration. Increasing cholesterol levels are related with an increase in ApoB-Hcy content. CysGly seems to reduce the interaction between LDL apoprotein and homocysteine, thus suggesting a hypothetical protective role against atherosclerosis by decreasing the Hcy levels transferred with the LDL from plasma to endothelial and sub-endothelial space.

163

**DIECI ANNI DI MEDICINA DI LABORATORIO.
STUDIO RETROSPETTIVO DEI PARAMETRI LIPIDICI
DAL 1997 AL 2006**

C. Vanni¹, F. Massimini¹, A. Heghes¹, C. Romano¹

¹*Medicina di Laboratorio, P.O. SS Annunziata, Chieti*

Scopo. Il lavoro analizza i dati relativi a parametri lipidici di interesse rilevante: Trigliceridi, Colesterolo totale, Colesterolo HDL. L'obiettivo è di definire se ci siano differenze fra gli anni e fra i vari gruppi campione ed in particolare in quello ambulatoriale afferente alla medicina di laboratorio del SS Annunziata di Chieti. Una maggiore attenzione è stata rivolta allo studio di possibili variazioni dei percentili nel tempo rispetto al sesso ed alle fasce di età.

Materiali e metodi. Sistemi Vitros chimica secca della JeJ in uso dal 1998

LIS Alchimia SCS.

SPSS per statistiche ed excel per importazione e raccolta dati.

Risultati e discussione. Nei servizi di medicina di laboratorio esistono anche dati di notevole capacità e soprattutto di una notevole fonte di informazioni "nascoste".

Il nostro lavoro ha voluto sfruttare al meglio queste capacità e con una specifica richiesta alla sw house abbiamo estrapolato complessivamente 341095 colesterolo totale, 313031 trigliceridi e 120302 colesterolo hdl (ospedalizzati ed ambulatoriali). Dall'intero gruppo campionario abbiamo selezionato solo il gruppo ambulatoriale e con questo si è proceduto all'analisi descrittiva ed inferenziale.

Riportiamo i dati descrittivi per sesso (mediana, mg/dL):

F n. 64447: 201 (Col. Tot); 56 (Col. HDL); 101 (Trig)

M n. 56380: 194 (Col. Tot); 47 (Col. HDL); 116 (Trig)

Oltre alla conferma dell'esistenza di una differenza statistica significativa fra sesso e fasce di età, abbiamo notato una variazione negli anni del colesterolo totale (mg/dL):

anno (Mediana F - Mediana M)

1997: 217 - 206.5

1998: 216 - 209

1999: 212 - 206

2000: 208 - 202

2001: 203 - 197

2002: 199 - 193

2003: 196 - 189

2004: 203 - 194

2005: 198 - 195

2006: 198 - 190

La continuità dei sistemi analitici ed il costante controllo degli stessi (CQI-VEQ) ci hanno permesso di escludere delle variabili importanti nella valutazione dei dati.

Le variazioni potrebbero dipendere da una maggiore presa di coscienza dell'utenza verso le patologie lipido correlate e/o da un cambio della popolazione dovuta sia a quella universitaria che all'immigrazione comunitaria ed extra-comunitaria.

Il nostro obiettivo è di integrare i dati con quelli del 2007 e 2008 e rianalizzare il tutto sia dal punto di vista descrittivo che inferenziale.

164

**DISTRIBUTION OF PLASMA CARDIAC
TROPONIN-I VALUES IN HEALTHY SUBJECTS:
PATHOPHYSIOLOGICAL CONSIDERATIONS**

A. Clerico², A. Fortunato³, A. Ripoli¹, C. Prontera¹, A. Mercuri¹, G.C. Zucchelli¹, M. Emdin¹

¹*Foundation Gabriele Monasterio - CNR, Institute of Clinical Physiology of Pisa*

²*Scuola Superiore S. Anna, Pisa*

³*Clinical Chemistry Laboratory, San Bortolo Hospital, Vicenza*

Background. The aim of this study is to evaluate the distribution of cardiac troponin I (cTnI) values, measured by ADVIA TnI-Ultra method (Siemens Medical Solutions Diagnostics srl) in healthy subjects and to characterize its relation to gender, age, as well as to N-terminal fragment of pro-Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP).

Methods. A Caucasian population of 692 healthy subjects (311 males and 381 females) with a mean (SD) age of 45.3 (17.3) years [range 11-89 years; females 46.5 (17.3) years, males 43.8 (17.1) years] was enrolled. The presence of cardiac or systemic acute or chronic diseases was excluded by history and accurate clinical evaluation.

Results. A significant difference was found between the cTnI values in men and women (men: median 0.012 µg/L, range from undetectable values to 0.196 µg/L; women: median 0.008 µg/L, range from undetectable values to 0.130 µg/L; p < 0.0001 by Mann-Whitney U test). When a multiple regression analysis was performed, NT-proBNP, gender and age significantly contributed to the regression with cTnI (R= 0.444, p < 0.0001).

Conclusions. Our data indicate that cut-off values, based on 99th percentile of cTnI distribution in apparently healthy subjects, can significantly vary according to age and gender of the reference population.

165

ASSOCIATION OF PLASMA CARDIOTROPHIN-1 WITH LEFT VENTRICULAR MASS INDEXES IN NORMOTENSIVE MORBID OBESITY

A.E. Malavazos¹, L. Morriconi¹, B. Ambrosi¹, G. Dogliotti², E. Galliera², M.M. Corsi²

¹U.O. Endocrinologia, Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Milano I.R.C.C.S. Policlinico San Donato

²Lab. di Patologia Clinica, Istituto di Patologia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano

Cardiotrophin-1 (CT-1), a member of the interleukin-6 superfamily of cytokines which induces cardiomyocyte growth, may be abnormally upregulated in hypertensive patients with inappropriate left ventricular mass (iLVM), suggesting that an excess of CT-1 may contribute to inappropriate left ventricular growth. CT-1 is mainly secreted by the left cardiac ventricle as a consequence of pressure overload and wall stretch and it induces longitudinal hypertrophy of cardiac myocytes by directing sarcomere assembly in series. Myocytes lengthening induced by a volume overload may possibly account for the remarkable increase in heart volume observed in morbid obesity, even in the absence of pressure overload. Thus, it is reasonable to consider a role for cytokines and other nonhemodynamic factors in ventricular remodeling, starting before the occurring of cardiovascular complications (eg hypertension). Here we want to add some additional information on the association of plasma CT-1 levels with LVM indexes (by echocardiography) in obese patients with LVH. We evaluated plasma CT-1 levels in 24 normotensive women with severe obesity (mean BMI: 43.4 ± 5.1 kg/m²) and with LVH (LVM indexed for height (LVMI) > 46.7 g/m, mean LVMI: 61.3 ± 9.7 g/m) and 15 normal-weight normotensive subjects without LVH. Plasma CT-1 was higher in obese patients than in controls (67.36 ± 10.2 vs 27.27 ± 4.11 fmol/mL, $p < 0.0001$). Plasma CT-1 was normalized by logarithmic transformation for the correlation analysis. A direct correlation was found between CT-1 and LVMI ($r = 0.61$, $p < 0.0001$), LVM ($r = 0.41$, $p < 0.001$), end-diastolic septum thickness ($r = 0.70$, $p < 0.0001$), end-diastolic posterior wall thickness ($r = 0.67$, $p < 0.0001$), even after correction for VAT (measured by TC) and fat-free mass (measured by bioelectrical impedance). Thus, these findings open new insights about a possible pathophysiological role for this cytokine in left ventricular growth in response to either pressure or volume overload and as an additional useful tool in the initial cardiac assessment of patients with LVH.

166

ADRENOMEDULLIN PLASMA LEVELS AS PREDICTORS OF LEFT VENTRICULAR REVERSE REMODELING IN PATIENTS TREATED WITH CARDIAC RESYNCHRONIZATION THERAPY

S. Del Ry¹, M.A. Morales¹, M. Maltinti¹, U. Startari¹, D. Giannessi¹, M. Piacenti¹

¹CNR Clinical Physiology Institute and Gabriele Monasterio Foundation, Pisa, Italy

Background. Adrenomedullin (ADM), a potent natriuretic and vasorelaxing peptide, has been isolated from human pheochromocytoma cells and from cardiovascular tissue. Increase in ADM plasma levels in congestive heart failure (CHF) patients (pts) is due to many cardiac and systemic factors and in particular to the greater plasma volume and to the activation of sympathetic nervous system.

Aim. To assess the role of plasma ADM levels in CHF pts treated by cardiac resynchronization therapy (CRT).

Methods. We studied 42 CHF pts (mean age 70 years, 27 males, NYHA Class III-IV) underwent CRT. Cause of CHF were idiopathic dilated cardiomyopathy in 27 pts, post ischemic in 15; all pts were in sinus rhythm and with complete left bundle branch block (QRS duration 138 ± 8 msec).

A complete echoDoppler exam, blood samples for brain natriuretic peptide (BNP) and ADM were obtained within 2 days before implantation.

Results. At 14 ± 6 months follow-up, > 1 NYHA Class improvement was observed in 30/42 pts. However, a $> 10\%$ reduction in end-systolic dimensions (ESD) was reported in 16 pts (Group I): $-18.2 \pm 2.3\%$; in the remaining 26 pts ESD change was $-1.5 \pm 3.2\%$ (Group II).

The two groups were comparable for age, sex, cause of LV dysfunction, ongoing therapy, QRS duration at baseline, ESD (60.3 ± 1.8 vs 59.7 ± 1.9 mm - Group I vs II), LVEF % (24.8 ± 1.2 vs $25.6 \pm 1.3\%$) and BNP (545 ± 80 vs 494 ± 89 pg/ml) pre implantation. Significantly higher pre CRT ADM levels were present in Group I than in Group II (25.8 ± 2.4 pmol/l vs 17.7 ± 1.6 , $p = 0.005$).

Conclusions. Significantly higher ADM levels - probably due to a highly activated sympathetic nervous system - indicate a subgroup of pts in whom significant reverse remodeling is observed after CRT.

Lower values of pre CRT-ADM may be related to hearts with more severe myocardial damage and without conditions to improve function despite resynchronization.

Reference

Pousset F et al. Plasma adrenomedullin, a new independent predictor of prognosis in patients with chronic heart failure. Eur Heart J 2000;21:1009-14.

167

OSTEOPONTIN IN ARTERIAL HYPERTENSION: ITS RELATIONSHIPS WITH INDEXES OF CLINICAL SEVERITY AND ORGAN DAMAGE

S. Del Ry¹, A. Mazzone¹, M. Cabiati², A. Ripoli¹, E. Fommei¹, D. Giannessi¹, S. Ghione¹

¹CNR Clinical Physiology Institute and Gabriele Monasterio Foundation, Pisa, Italy

²Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

Background. Osteopontin (OPN) is a phospho-glycoprotein of the extracellular matrix with cytokine function which at the vascular level acts as a promoter of remodeling and has been implicated in atherosclerosis, microvascular fibrosis and cardiovascular calcifications. In arterial hypertension a role of OPN has been hypothesized in the pathophysiology of carotid artery atherosclerosis.

Aim. To investigate the possible association of OPN with indexes of hypertensive severity and organ damage.

Methods. We measured plasma OPN levels by a commercially available ELISA kit in 65 consecutive hypertensive out-patients (age 61±13yrs) afferent to the Hypertension Unit. In each patient blood pressure levels, laboratory parameters and cardiovascular pathology were investigated by standardized examinations. As control we studied 52 healthy subjects.

Results. OPN plasma levels were significantly increased in patients with respect to healthy controls (28.5±1.5 ng/ml vs. 20.8±1.4 ng/ml, p=0.005). In particular, OPN levels were significantly higher in patients with serum creatinine >1mg/dL, in the presence of carotid atherosclerotic plaques, left ventricular hypertrophy, renovascular disease or diabetes (p<0.001 for each comparison). OPN was also found to correlate with age, systolic blood pressure, serum creatinine and NT-proBNP (p<0.001 for all correlations); finally OPN was correlated with septum or posterior wall thickness and the Doppler index of renal vascular resistances (p<0.005 for all correlations).

Conclusions. OPN appears to be associated with indexes of clinical severity and organ damage in arterial hypertension, suggesting a possible role of the molecule in the vascular inflammatory and remodelling processes of the hypertensive disease.

Reference

Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993;7:1475-82.

168

DETERMINAZIONE DELLA TIOLATTONASI, PARAOXONASI E ARILESTERASI DELLA PON1 IN PAZIENTI CON INFARTO ACUTO DEL MIOCARDIO

F. Romeo¹, S. Iona¹, R. Massoud¹, A. Pierantozzi¹, P. Ceravolo¹, G. Fucci¹, P. Casalino¹, C. Cortese¹, G. Federici¹

¹Dip. di Medicina Interna, Cattedra di Cardiologia e Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Roma "Tor Vergata"

Introduzione. La paraoxonasi (PON1) è un'esterasi calcio dipendente associata alle HDL plasmatiche che idrolizza composti organofosforici come il parathion, esteri aromatici carbossilici (attività arilsterasica) ed un'ampia gamma di lattoni tra cui l'omocisteina tiolattono (attività tiolattonasica). Una associazione con il rischio di aterosclerosi e sue complicanze è stata descritta in numerosi lavori mentre mancano dati sull'andamento delle varie attività enzimatiche in corso di infarto acuto del miocardio.

Materiali e Metodi. Le attività paraoxonasica, arilsterasica e tiolattonasica, recentemente ottimizzate nel nostro laboratorio, sono state determinate spettrofotometricamente utilizzando come substrato enzimatico rispettivamente, il paraoxone, il fenilacetato e il γ -tiobutirrolattone, su siero di pazienti con infarto acuto del miocardio (n.28) al tempo zero (T0), a 24 ore (T1) e a 48 ore (T2) dal ricovero, rispetto ad una popolazione di controllo apparentemente sana (n.54).

Risultati. Dall'analisi statistica complessiva (pazienti e controlli), risulta che: la distribuzione delle attività enzimatiche presenta un andamento normale (Kolmogorov Smirnov p > 0,05) e che non esistono differenze significative tra pazienti al T0 e controlli. Nei soggetti con infarto esistono differenze significative tra i tempi T0, T1 e T2 per l'attività paraoxonasica e arilsterasica (aumento) e tiolattonasica (diminuzione).

Conclusioni. Le nostre osservazioni su pazienti con infarto acuto del miocardio ai differenti tempi di osservazione mostrano una divergenza tra le varie attività enzimatiche substrato specifiche della PON1 e suggeriscono una possibile applicazione come biomarkers dell'insulto ischemico miocardico

Bibliografia

Domagala TB et al. The correlation of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase (PON1) protein with coronary heart diseases status. *Cell Mol Biol* 2006;52:4-10.

169

EFFETTO DELLE VARIABILI PRE-ANALITICHE NELLA DETERMINAZIONE DELL'ISCHEMIA MODIFIED ALBUMIN

E. Novello¹, M.M. Mion¹, M. Zaninotto¹, S. Altinier¹, M. Plebani¹

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

Introduzione. E' stato valutato l'effetto delle principali variabili pre-analitiche (modalità di prelievo, conservazione del campione) sulle concentrazioni di Ischemia Modified Albumin (IMA), recentemente proposta come marcatore biochimico precoce di ischemia cardiaca.

Materiali e metodi. Da 10 volontari sani sono stati raccolti 100 campioni di sangue senza anticoagulante. 20 campioni sono stati prelevati senza e con laccio emostatico (gruppo T0, T1 rispettivamente), centrifugati e congelati entro un'ora dal prelievo. 80 campioni (raccolti con laccio emostatico) sono stati trattati e conservati in differenti condizioni: 1) Centrifugazione: dopo 30 minuti dal prelievo (gruppo A), al momento del congelamento (gruppo B); 2) temperatura di conservazione: 2-8°C e 25°C; 3) Tempo dalla raccolta al congelamento: 6 e 12 ore. I valori di IMA (U/mL, ACB Test[®]) sono stati determinati su siero mediante l'analizzatore Roche/Hitachi Modular System P.

Risultati. Modalità di prelievo: nei campioni del gruppo T1, rispetto al gruppo T0, è stato riscontrato un decremento (+1.06/-7.69 %) delle concentrazioni di IMA (p=0.0112). Tempo e temperatura di conservazione: non è stata osservata una variazione statisticamente significativa nella concentrazione di IMA nel gruppo A in relazione alla temperatura e al tempo di conservazione. Nei campioni del gruppo B (conservazione a 2-8°C) si assiste ad un incremento (-1.12/+14.3%) dei valori di IMA a 12 ore (p=0.0016) non osservato invece nel gruppo B (conservazione a 25°C). Una differenza nelle concentrazioni di IMA tra gruppo A e gruppo B è stata verificata solo nei campioni conservati per 12 ore a 2-8°C (p=0.0069).

Conclusioni. Le variabili preanalitiche studiate, raramente valutate in altri studi, sembrano influenzare significativamente le concentrazioni di IMA. Tuttavia, la marcata variabilità intra-individuale nelle concentrazioni di IMA, osservata nelle condizioni pre-analitiche testate, dimostra il complesso e in gran parte sconosciuto equilibrio tra fattori ossidanti ed antiossidanti individuali che intervengono nella formazione della molecola e quindi nella misura della sua concentrazione circolante.

Bibliografia

Bar-Or D et al. The cobalt-albumin binding assay: Insights into its mode of action. Clin Chim Acta 2008;387:120-7.

170

CONFRONTO TRA BNP E NT-PROBNP NELLA DIAGNOSI DI EDEMA POLMONARE CARDIOGENO

V. Rizza¹, G. Olivieri¹, R.G. Martinotti², M. Biancardi², F. Lavarda¹

¹Lab. di Analisi Chimico Cliniche e di Ematologia, Osp. San Carlo Borromeo, Milano

²U.O. Medicina d'Urgenza, Osp. San Carlo Borromeo, Milano

Introduzione. In un Dipartimento di Emergenza (DE) è difficile porre diagnosi differenziale tra edema polmonare cardiogeno (EPC) e dispnea di origine respiratoria. BNP e NT-proBNP si sono dimostrati utili per la diagnosi di insufficienza cardiaca pur avendo due emivite diverse in quanto l'ormone attivo BNP esplica la sua azione e poi viene rimosso via recettoriale, mentre il frammento NT-proBNP dura in circolo più a lungo ed è rimosso via escrezione renale.

Scopo dello studio. Confrontare l'utilità dei due peptidi nella diagnosi differenziale di dispnea cardiogena.

Metodi. In 77 pz. (età media 81 anni; DS 9) afferenti al DE con dispnea acuta sono stati misurati, al momento dell'ammissione, l'NT-proBNP e il BNP con metodi immunochimici su sistema Dimension RXL (Siemens) e TRIAGE (Biosite) rispettivamente.

Risultati. Dei 77 pz, 36 hanno una diagnosi finale di EPC e 41 una dispnea non EPC. Vi è correlazione tra i valori di NT-proBNP e BNP (r=0.66, p<0.0001), tra NT-proBNP e Creatinina Clearance (CrCl r=-0.47, p= 0.0131); non c'è correlazione tra BNP e Creatinina Clearance (r=-0.29, p=0.1592). I valori della mediana dell'NT-proBNP e del BNP sono più elevati nei pazienti con EPC (11110 vs 4370 pg/mL, p=0.001; 931 vs 417 pg/mL, p=0.0005, rispettivamente). Le aree sottese alla curva (AUC), calcolate con ROC analisi, dell'NT-proBNP e del BNP non sono significativamente diverse (0.736 vs 0.725, p=0.798). I migliori valori soglia per NT-proBNP e BNP sono 10552 e 819 pg/mL, rispettivamente. L'accuratezza diagnostica di NT-proBNP e BNP è: 69% (IC95% 55-82) e 70% (IC95% 52-84), rispettivamente. Valori elevati di entrambi i peptidi si associano ad una più elevata mortalità intraospedaliera: pz vivi=63, deceduti=14; mediane NT-proBNP: 6054 vs 18447 rispettivamente (p=0.0015); mediane BNP: 608 vs 1061 rispettivamente (p=0.0451)

Conclusioni. L'NT-proBNP ma non il BNP è correlato alla CrCl. Nella diagnosi di EPC in una popolazione con età >70 anni NT-proBNP e BNP possiedono lo stesso potere diagnostico. La mortalità intraospedaliera si associa a elevati valori di NT-proBNP e BNP.

Bibliografia

Ray P et al. Comparison of BNP and pro-BNP in the diagnosis of Cardiogenic pulmonary Edema in pz aged 65 and older. JAGS 2005;53:643-8.

171

MULTICENTRE EVALUATION OF THE SECOND GENERATION ELECSYS NT-proBNP ASSAY

C. Valente¹, I. Conti¹, F. Calderaro¹, Garcia-Beltran², B. Gremmler³, K. Hensel-Wiegel⁴, H. Luthé⁵, S. Meisel⁶, J. Merce⁷, A. Mühlbacher⁸, J. Ordóñez⁷, K.H. Rhode⁵, C. Schulz⁹, R. Tauber⁴, V. Klemt¹⁰, J. Jarausch¹⁰, M. Panteghini¹

¹Ospedale Luigi Sacco, Milano, Italy

²Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

³Marienhospital, Bottrop, Germany

⁴Charité – Universitätsmedizin, Berlin, Germany

⁵Zentrum Innere Medizin, Göttingen, Germany

⁶Hillel Yaffe Medical Center, Hadera, Israel

⁷Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

⁸Transfusionsmedizin, Universitätskliniken Salzburg, Austria

⁹Klinikum rechts der Isar, München

¹⁰Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

A new Elecsys assay for NT-proBNP was evaluated at 9 evaluation sites in Europe and Israel on various Elecsys analyzers. The assay is a new formulation of the Elecsys NT-proBNP assay where the polyclonal sheep antibodies in the first generation assay were replaced by a monoclonal mouse and a monoclonal sheep antibody. Goal of the current study was to show the comparability of the two versions of the assay along with the determination of the general performance of the new assay. The imprecision was determined in two control materials and up to 8 human serum and heparin plasma pools in the range between 28 ng/L and 2700 ng/L. Intra-assay and total CVs in pools above 30 ng/L were in a range between 0.7% and 5.5% (21 replicates) and 1.5% and 5.3% (60 replicates), respectively. Pooled data from method comparison studies in 3977 routine samples showed a good comparability to the first generation assay with an intercept of -1 ng/L and a slope of 0.95 (Passing-Bablok). The correlation coefficient was 0.998. A method comparison study in 719 blood donors showed a good comparability (range: 5 – 754 ng/L, intercept -1 ng/L, slope 0.94, $r = 0.988$). In measuring series performed at three evaluation sites in a total of 294 samples the evaluation lot was compared with two additional reagent lots. Regression analysis according to Passing-Bablok yielded intercepts between -4 and 9 ng/L and slopes between 0.96 and 1.06. Correlation coefficients were >0.999 . Concordance between the first and second generation NT-proBNP assays was determined in relation to the cutoffs in measuring series with samples from clinically characterized patients. The concordance in four patient cohorts defined by the NYHA classification ($n = 318$) was 99.7% (95% CI: 98.3% to 100%).

In summary, this multicentre evaluation generated homogeneous performance data and also demonstrated a good comparability to the first generation assay when evaluated in different clinical settings. The previously defined cut-offs can be maintained with no changes in the cardiologists' expectations.

172

I PERCORSI CLINICO ORGANIZZATIVI (PCO) NEL MIGLIORAMENTO DELL'APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA: L'ESEMPIO DELLA DIAGNOSI DELL'INFARTO ACUTO DEL MIOCARDIO (IMA)

N. Ursicino¹, E. Zepponi¹, F. Meligeni², L. Mazzilli³, G. Di Gianfilippo³

¹UO Lab.di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia Osp."S.Camillo de' Lellis" ASL di Rieti

²UO Pronto Soccorso Osp."S.Camillo de' Lellis" ASL di Rieti

³UO Audit Clinico e Sistemi informativi sanitari ASL di Rieti

Obiettivi. Migliorare il TAT dei marcatori di danno miocardico per i pazienti che si presentano al Pronto Soccorso
Metodologia. I Percorsi Clinico Organizzativi (PCO) nascono dall'esigenza delle varie UO di migliorare la qualità dell'assistenza a seguito del riscontro di una o più criticità (vedi il Pronto Soccorso che riteneva il TAT dei marcatori di danno miocardio eccessivamente elevato) in una logica di governo clinico.

Risultati. Nel confronto con gli specialisti in medicina di laboratorio, che hanno provveduto all'estrazione dei dati dal sistema gestionale del laboratorio, è emerso che l'intervallo medio tra l'accettazione in Pronto Soccorso e l'invio dei campioni in Laboratorio era pari a circa 20'; il Tempo medio di refertazione dei marcatori era viceversa pari a circa 46'. È emerso inoltre che la letteratura più recente (1) indica nella Troponina il marcatore da usare. Per cui si è arrivati, di comune accordo, alla revisione del protocollo 2006, che prevedeva in caso di sospetto di IMA la richiesta di Troponina e Mioglobina, all'adozione della sola Troponina a far data dal 30 giugno u.s. Al fine di minimizzare il tempo di trasporto dei campioni dal Pronto Soccorso al Laboratorio è stato deciso inoltre di proporre l'acquisizione di un sistema di trasporto pneumatico degli stessi campioni.

Discussione. La definizione dei PCO, nella nostra realtà aziendale, sta avendo come principale risultato quello di favorire una modalità di confronto tra le diverse UO nel rispetto della EBM. Il confronto si traduce poi nell'individuazione di soluzioni operative che portano al miglioramento, come nel caso della diagnosi di IMA al Pronto Soccorso, anche dell'appropriatezza della richiesta.

Bibliografia

1. Thygesen K et al. Universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal* 2007;28:2525-38.

173

MISMATCH BETWEEN mRNA CARDIAC EXPRESSION OF BNP AND CNP IN PACING-INDUCED HEART FAILURE

M. Cabiati², V. Lionetti², C. Caselli², T. Prescimone¹, F. Recchia², D. Giannessi¹, S. Del Ry¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology and G. Monasterio Foundation, Pisa, Italy

²Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

Background. It has been recently demonstrated that in an animal model of heart failure (HF) the high-frequency pacing of the left ventricle (LV) free wall causes a dyssynchronous pattern of contraction that leads to progressive cardiac failure with pronounced differences in regional contractility.

Aim. to evaluate the possible variation of brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP) mRNA expression in the anterior/anterior lateral region (pacing site) compared with the infero-septal region (opposite site) to individualize the possible association between the contraction patterns and the expression of these biomarkers.

Methods. Cardiac tissue was collected from male adult minipigs without (control, n=6) and with pacing-induced HF (n=8). We collected cardiac tissue of anterior left ventricular (LV) wall, named pacing-site (PS), and the tissue remote from the pacing-site, named opposite site (OS). mRNA was extracted with the method of phenol/guanidine-thiocyanate/chloroform and polymerase chain reaction (PCR) was carried out using Ready to Go RT-PCR Beads.

Results. We observed significant difference in mRNA expression for BNP in PS and OS region. The expression of mRNA coding for BNP resulted higher in PS respect to controls (BNP/GAPDH: 0.65 ± 0.11 vs. 0.35 ± 0.04 , $p=0.02$) whereas a significant reduction was observed in OS (BNP/GAPDH: 0.36 ± 0.05 , $p=0.018$ PS vs. OS) where BNP levels resulted similar to those of controls. Moreover we did not observed significant difference in mRNA expression for CNP also if higher levels were observed in PS and in OS respect to controls (CNP/GAPDH: controls 0.089 ± 0.036 , PA 0.289 ± 0.23 , PP 0.54 ± 0.16).

Conclusions. Although further investigations are necessary, this result could suggest a probably myocardial hibernation. The higher levels of BNP mRNA expression in PS are in tune with a reduction of contractile function while levels higher in OS for CNP mRNA expression could suggest the presence of a major endothelial dysfunction.

Reference

Lionetti V et al. Mismatch between uniform increase in cardiac glucose uptake and regional contractile dysfunction in pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2747-56.

174

EVALUATION OF HIGH-SENSITIVITY C-REACTIVE PROTEIN AND HOMOCYSTEINE IN YOUNG HEALTHY WOMEN IN RELATION TO ORAL CONTRACEPTIVE USE

S. Cauci¹, M. Di Santolo¹, Culhane³, G. Stel², S. Guaschino⁴

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

²Dept. Experimental and Clinical Pathology and Medicine, School of Medicine, Univ. Udine, Udine, Italy

³Dept. Obstetrics and Gynecology, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA, USA

⁴Dept. Reproductive and Development Sciences, School of Medicine, Univ. Trieste, Trieste, Italy

Purpose. As oral contraceptives (OCs) increase the risk of CVD, we evaluated the effects of the third generation OC on hsCRP and HCY levels in young, normal-weight, healthy women to contribute elucidation of OC serum dysregulative effects.

Methods. Blood markers were evaluated in a total of 277 young healthy white women (23 year-olds; body-mass index 21 kg/m^2). 77 OC users were compared to 200 non-OC users. Progressive cutoffs of hsCRP and homocysteine levels were examined.

Results. Levels of hsCRP at high risk of CVD from 3.0 to $<10.0 \text{ mg/L}$ were found in 27.3% of OC users and in 8.5% of non-OC users [odds ratio (OR) 4.04; 95% CI 1.99-8.18]. Levels of hsCRP at intermediate risk from 1.0 to $<3.0 \text{ mg/L}$ were found in 32.5% of OC users and in 11.0% of non-OC users (OR 3.89; 95% CI 2.03-7.46). Notably, non-OC users were 8.65 (95% CI 4.39-17.1) times as likely to demonstrate a protective level of hsCRP ($<0.5 \text{ mg/L}$) compared to OC users. OC use increased serum triglycerides ($P<0.001$) and total cholesterol ($P=0.001$), however HDL not LDL cholesterol contributed to this increase. Interestingly, a decreased ratio of LDL to HDL cholesterol was observed in OC users compared to non-users ($P=0.016$). OC use did not affect homocysteine levels.

Conclusion. We demonstrated that third generation contraceptive pills markedly elevate low-grade inflammation as assessed by hsCRP concentrations in healthy young non-obese women. This OC effect may have implications for development of CVD, venous thrombosis as well as of other inflammatory diseases.

Reference

Cauci S, Di Santolo M, Culhane JF, Stel G, Gonano F, Guaschino S. Effects of third-generation oral contraceptives on high-sensitivity C-reactive protein and homocysteine in young women. *Obstet Gynecol* 2008;111:857-864.

175

NT-proBNP NEI PAZIENTI CON DISPNEA ACUTA IN MEDICINA D'URGENZA: QUALE LIVELLO DECISIONALE?A. Dolci¹, P. Villa², R. Dominici¹, S. Guzzetti², M. Panteghini¹¹Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, AO "Luigi Sacco", Milano e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi di Milano²U.O. Medicina d'Urgenza, AO "Luigi Sacco", Milano

La determinazione del NT-proBNP ha un importante ruolo diagnostico in medicina d'urgenza nell'esclusione dell'origine cardiaca della dispnea acuta. In particolare, una singola determinazione di NT-proBNP all'ammissione in Pronto Soccorso (PS) mostra un elevato valore predittivo negativo (VPN) (99% al cutoff di 450 ng/L nello studio PRIDE). Pertanto l'impiego del NT-proBNP in questo contesto clinico è stato previsto nelle raccomandazioni sull'utilizzo ottimale dei marcatori cardiaci del nostro ospedale. In questo studio retrospettivo abbiamo valutato 498 pazienti con dispnea acuta (248 maschi, età: 77±12 anni) in cui è stato eseguito all'ammissione in PS il NT-proBNP (Roche, Elecsys 2010). La diagnosi finale di scompenso cardiaco acuto (AHF) era posta da un cardiologo sulla base della storia clinica del paziente, dei segni e sintomi clinici e della radiografia del torace, senza conoscere il risultato del NT-proBNP. Sono stati diagnosticati 306 pazienti (61,4%) con AHF e 192 con dispnea di altra origine. Il NT-proBNP (cutoff 450 ng/L) risultava positivo in 295 dei 306 pazienti con AHF, con una sensibilità del 96,1% (CI: 93,2-98,0) mentre 102 dei 192 pazienti senza AHF risultavano negativi con una specificità del 52,6% (CI: 45,3-59,8). Il VPN del NT-proBNP era pari a 89,4% ed il valore predittivo positivo (VPP) a 76,3%. Avendo riscontrato un VPN inferiore a quello riportato nello studio PRIDE, abbiamo rivalutato l'efficacia del NT-proBNP al cutoff di 300 ng/L, suggerito dallo studio ICON, per l'esclusione di AHF in PS. Il NT-proBNP risultava positivo in 300 pazienti con AHF, con una sensibilità del 97,7% (CI: 95,3-99,1), mentre erano negativi 81 pazienti senza SCCA, con una specificità del 41,7% (CI: 34,6-49,0). Il VPN era 92,0% e il VPP 72,7%. La differenza di sensibilità rilevata ai due cutoff non risultava significativa (test chi-quadro, P=0,32), mentre la specificità ottenuta a 450 ng/L era significativamente maggiore di quella al cutoff di 300 ng/L (P=0,04). In conclusione, non avendo rilevato significative variazioni di sensibilità e VPN con l'abbassamento del livello decisionale, abbiamo confermato la migliore prestazione del NT-proBNP al livello decisionale di 450 ng/L, al quale, a parità di VPN, corrisponde una specificità più elevata.

176

MARKERS ASSESSMENT OF CARDIAC DAMAGE BY AN INTEGRATED SYSTEM OF ABBOTT (ARCHITECT ci16200)A. Dello Russo¹, A. Nappi¹, M. Gelzo¹, S. Clericuzio¹, R. Barone¹, M. Galdiero¹, G. Corso¹¹D.As.Me.Lab. and Department of Biochemistry and Medical Biotechnology, University of Naples, Federico II

Aims. Carry out an evaluation of cardiac troponin I (cTnI), CK-MB and Myoglobin using an integrated analyzer (DC/IA, Abbott ARCHITECT ci16200) to verify the analytical performances and correlations with other methods on patient samples.

Methods. For the analysis cTnI on ARCHITECT were assessed precision (on 3 quality control levels for 20 days), recovery, linearity and carryover, analytical lower limit of detection (calculated using the concentration level of 0 and the first point of calibrators), the functional sensitivity (calculated as the lowest level of concentration with a CV %<10 by replicates on patient samples ranging between 0,017 and 0,212 ng/mL) and the 99th percentile concentration on plasma samples from healthy subjects. The results of cTnI, CK-MB and Myoglobin from patient samples were compared with those obtained by DiaSorin Liaison analyzer.

Results. A) cTnI: the cumulative CV on the three levels of quality control (0,13; 0,52 and 13,87 ng/mL) were 6,75; 4,34 and 4,52%, respectively. Recovery, linearity and carryover appeared satisfactory. The lower limit of detection and the functional sensitivity, respectively of 0,007 and 0,042 ng/mL, were in agreement with expected values. The 99th percentile from healthy subjects (n=134, average age of 37.8 years) was 0,010 ng/mL. The comparison study with Liaison on 71 patient samples showed a good correlation (r=0,914) and a proportional "bias", with values obtained from ARCHITECT consistently higher. Assuming a threshold of 0.04 ng/mL, there were 8 discordant results (11%), six of which positive on ARCHITECT and negative on Liaison.

B) CK-MB and Myoglobin: for these parameters, although assessed on a smaller number of samples, the correlation between Liaison and ARCHITECT was extremely high (r = 0,996 and 0,990), respectively, with a concordance among values ranging between 95 to 105%.

Conclusions. The analysis of cardiac troponin I on ARCHITECT seem to be appropriate for diagnosis of ischemic coronary disease, according to the more recent guidelines¹. The operational features allow an easy application of the analytical system for a high-throughput "routine" and, as recommended, ensure a turn-around time less than 60 minutes from sampling.

Reference

1. Morrow D et al. Clin Chem 2007;53(4):552-74.

177

NT-proBNP DIFFERENT SECRETORY PATTERNS IN MYOCARDIAL INFARCTION

S. Ferraro¹, A. Lupi¹, G. Marano², C. Vendramin³, L. Rossi¹, L. Ciardi³, G. Bellomo³, E. Biganzoli², A.S. Bongo¹

¹SCDO Cardiologia 2, AOU Maggiore della Carità, Novara

²Istituto di Statistica Medica e Biometria, Università degli Studi di Milano

³SCDU Laboratorio Ricerche Chimico Cliniche, AOU Maggiore della Carità, Novara

Aim. In myocardial infarction (MI) NT-proBNP represents a reliable prognostic tool despite high variability. Study aim was to investigate in MI, the dependence of NT-proBNP levels at admission, from sympathetic activation and glomerular impairment, assessed respectively by Chromogranin A (CgA) and Cystatin C (CC) measurements; moreover we compared BNP/NT-proBNP kinetics.

Methods. We enrolled 132 patients, 90 ST elevated acute coronary syndroms (STE-ACS) and 42 non ST ACS (NSTE-ACS), admitted within 24h from symptoms with creatinine levels lower than 1.6mg/dl. In all patients NT-proBNP (DPC), CgA (CIS-BIO), CC (Dade-Bohering) were measured. In 33 STE-ACS patients, at admission and in the following 6h, 24h and 48h, the contemporary kinetics of NT-proBNP, BNP and hsTn I were evaluated. A multiple regression model was used to investigate the dependence of NT-proBNP levels from CgA, CC, time from the onset of symptoms, ACS subsets (STE-ACS/NSTE-ACS) and gender, adjusting for the effect of LVEF and age. An analysis of interactions was performed.

Results. NT-proBNP levels showed a positive asymmetric distribution even after logarithmic conversion. NT-proBNP levels were higher in NSTE-ACS with a longer time from symptom onset. From multiple regression analysis, evidence was found of two interactions involving ACS subsets: the first with CgA levels and the second with age. The first proved the inversion of the secretory pattern of NT-proBNP in STE-ACS vs NSTE-ACS. This could be linked to the characteristic of the marker, stored in secretory vesicles, and to the different sympathetic activation in the two groups. From the second interaction, only in STE-ACS the effect of age on NT-proBNP secretion followed an increasing curve. The time release curves showed for both natriuretic peptides a rising within 11h from symptoms, NT-proBNP peaked later than 48hs, BNP within 29hs and hsTn I within 11hs.

Discussion. Our data showed in this MI population that only sympathetic activation but not glomerular impairment could affect NT-proBNP secretion yielding different secretory patterns in STE/NSTE-ACS. Furthermore the time elapsed from symptoms, carries a critical role on NT-proBNP evaluation.

Reference

Hall C. NT-proBNP: The Mechanism Behind the Marker. *J Card Fail* 2005;11(S):S81-S83.

178

REAL TIME PCR EVALUATION FOR C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE AND FOR ITS SPECIFIC RECEPTOR, NPR-B IN CARDIAC TISSUE OF NORMAL AND CHRONIC HEART FAILURE ANIMALS

S. Del Ry¹, M. Cabiati², V. Lionetti², M. Emdin¹, F. Recchia², D. Giannessi¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology and G. Monasterio Foundation Pisa, Italy

²Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

Background. C-type natriuretic peptide (CNP) was recently found in the myocardium, but possible differences between atrium and ventricle production are so far lacking.

Aim. To evaluate the expression of transcripts coding for CNP and for its specific receptor, NPR-B, in cardiac tissue (right and left atrium and ventricle) of normal and HF animals.

Methods. Cardiac tissue was collected from male adult minipigs without (control, n=5) and with pacing-induced HF (n=5). HF was induced by rapid pacing (180 beats/min) for 3 weeks. mRNA was extracted with the method of phenol/guanidine-thiocyanate/chloroform. The expression of mRNA coding for CNP and NPR-B was determined in myocardial tissue (n=40) by Real Time-PCR with DDcT method. As overall control, a parallel Real Time-PCR assay for BNP mRNA expression was carried out in the same samples.

Results. CNP gene expression was observed in controls and at 3 weeks of pacing resulting lower than that of BNP (left ventricle: p=0.05 controls vs. HF). As expected, BNP gene expression in all the cardiac chambers resulted higher after 3 weeks of pacing compared to normal heart (right atrium and left ventricle: p=0.003 controls vs. HF). Moreover, BNP mRNA expression was higher in atrium than in ventricle. We also observed higher, but not significantly, levels of CNP mRNA expression between normal and HF animals in all chambers. The NPR-B resulted to be expressed in all cardiac regions analyzed, and a down-regulation was observed in ventricles after HF (right ventricle p=0.001 controls vs. HF).

Conclusions. In the present study, we provided the first evidence of CNP and NPR-B expression in tissue from normal and HF. The increased myocardial CNP synthesis was associated to the NPR-B down regulation in HF. The co-localization of the CNP system and its specific receptor suggests a possible role of this peptide in a complex pathology such as HF and the present results may prompt novel therapeutical strategies targeting NPR-B.

Reference

Kalra PR et al. Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure. *Circulation* 2003;107:571-3.

179

TIME-COURSE OF PLASMA NT-PROC-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE IN END-STAGE HEART FAILURE PATIENTS SUPPORTED BY LEFT VENTRICULAR ASSIST DEVICE IMPLANT

M. Cabiati², C. Caselli², S. Del Ry¹, R. Caruso⁴, J. Campolo⁴, S. Turchi¹, L. Martinelli³, D. Giannessi¹, O. Parodi⁴

¹CNR institute of Clinical Physiology, Fondazione G. Monasterio, Pisa, Italy

²Scuola Superiore S. Anna, Pisa, Italy

³Dipartimento di Cardiocirurgia, Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano, Italy

⁴CNR Institute of Clinical Physiology, Milano, Italy

Introduction. Atrial natriuretic peptide (ANP) and B-type natriuretic peptide (BNP) as well as the respective amino-terminal NT-proANP and NT-proBNP have now been well established as predictors of outcome in patients with heart failure (HF). C-type natriuretic peptide (CNP) and NT-proCNP are increased in HF patients as a function of disease severity, supporting a role for these peptides in the pathophysiology of HF, but their modifications during left ventricular assist device (LVAD) implant are lacking.

Aim. To evaluate the time-course of natriuretic peptides in end-stage HF patients undergoing LVAD implant in order to recognize new reliable predictive biomarkers of cardiac recovery during LVAD.

Material and methods. Five end-stage HF patients (NYHA class III and IV; age: 57 ± 11 yrs; LVEF% <20) undergoing LVAD implantation were studied. Clinical hemodynamic evaluation and blood samples were obtained at admission (T1) and at 4, 24, 72 hrs and 1, 2, 4 weeks (T2-T7) after LVAD implant. NT-proANP and NT-proCNP were measured in plasma EDTA and aprotinin samples by a direct ELISA (Biomedica Gruppe) while NT-proBNP by the Elecsys® 2010 analyzer (Roche Diagnostics).

Results: The NT-proCNP time-course during LVAD was the following: T1= 88.8 ± 12.8 pg/ml; T2= 144 ± 29.8 ; T3= 241.6 ± 86.8 ($p < 0.05$ vs T1); T4= 229.7 ± 66.4 ; T5= 162.3 ± 66.5 ; T6= 175.3 ± 47.7 ; T7= 76.9 ± 8 ($p = ns$ vs T1). NT-proANP showed a similar pathway while NT-proBNP is reduced after LVAD implant (T1= 4.1 ± 2.2 ng/ml; T3= 3.0 ± 0.4), remaining lower than at baseline until 4 weeks (T7= 3.1 ± 0.9 ng/ml). NT-proCNP positively correlated with NT-proANP ($p = 0.03$) while no correlation was found with NT-proBNP.

Conclusions. This study reports for the first time original data on NT-proCNP levels after LVAD as a function of the time. The natriuretic peptides are differently modulated by LVAD, although all peptides resulted reduced after 4 weeks from implantation. The parallel determination of these effectors could allow us to obtain an integrated description of pathophysiological changes occurring during mechanical support.

Reference

Kemperman H et al. B-Type Natriuretic Peptide (BNP) and N-Terminal proBNP in Patients with End-Stage Heart Failure Supported by a Left Ventricular Assist Device. Clin Chem 2004;50:1670-2.

180

MONITORAGGIO DELL'EFFICACIA DI STRATEGIE PER L'IMPIEGO OTTIMALE DEI BIOMARCATORI CARDIACI A DUE ANNI DALL'INTRODUZIONE

R. Dominici¹, A. Dolci¹, C. Valente¹, M. Panteghini¹

¹Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, AO Luigi Sacco, e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi, Milano

Dall'ottobre 2005 sono state introdotte nel nostro Ospedale nuove strategie per l'impiego dei marcatori cardiaci, valutandone la loro efficacia dopo un anno di utilizzo. In particolare, un uso più appropriato dei marcatori ha determinato un'importante riduzione del numero di analisi eseguite associate ad una significativa compressione della spesa per i reagenti (1). Dal momento che è noto che, con il passare del tempo, l'aderenza alle linee guida tende a diminuire, abbiamo ripetuto l'audit a distanza di due anni dall'introduzione delle raccomandazioni al fine di verificare se i risultati sopra descritti si fossero mantenuti nel tempo. Sono stati confrontati due periodi, ott 2005-sett 2006 (Y1) e ott 2006-sett 2007 (Y2), corrispondenti, rispettivamente, al primo ed al secondo anno di applicazione delle raccomandazioni. Il numero totale degli esami eseguiti, relativi ai tre marcatori utilizzati (troponina T (TnT), NT-proBNP e CK-MB massa), si è ridotto da 18.214 (Y1) a 17.025 (Y2), con un'ulteriore diminuzione del 6,5% rispetto al primo anno di applicazione. Il numero di determinazioni dell'isoenzima CK-MB, utilizzato esclusivamente nel protocollo per la quantificazione dell'area di necrosi miocardica, è passato da 1981 (Y1) a 1842 (Y2) (-7%). La correttezza nell'esecuzione di questo protocollo era verificata nel 84% dei casi (n. totale protocolli/anno, 269), confermando la buona "compliance" già ottenuta nel primo anno di utilizzo. Il numero di determinazioni della TnT si è ridotto da 14.601 (Y1) a 13.350 (Y2) (8,6%), mentre NT-proBNP ha mostrato un incremento pari al 11,8%, passando da 1632 (Y1) a 1825 (Y2). Tale incremento è da ritenersi un indice dell'impiego crescente di questo esame nella diagnosi differenziale della dispnea acuta. Il costo economico complessivo su base annua per l'esecuzione delle determinazioni sopra descritte si è ulteriormente ridotto di 21.620 € (da 114.880 € in Y1 a 93.260 € in Y2, -18,8%). La verifica dei più importanti aspetti quantitativi a due anni dall'introduzione delle strategie aziendali indica che gli obiettivi di contenimento del numero e dei costi degli esami interessati sono stati non solo pienamente mantenuti, ma anche in misura significativa migliorati.

Bibliografia

1. Valente C, Dominici R, Dolci A, et al. Biochim Clin 2007;31:185.

181

DOSAGGIO DELLA TIMIDINA KINASI E DELLA PROCALCITONINA NEI PAZIENTI ONCOEMATOLOGICI: DATI PRELIMINARI

G. Bellesi¹, F. Innocenti¹, S. Burbui¹, P. Casprini², M.S. Camiciottoli², A. Celli², A. Ruggeri², F. Balboni¹, B. Morrocchi¹, C. Sartori³, D. Di Martino³

¹Laboratorio Analisi e U.O. Ematologia IFCA Firenze

²Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Osp. Misericordia e Dolce Prato

³DiaSorin S.p.A., Saluggia (VC)

La timidina kinasi (TK) è implicata nella sintesi del DNA catalizzando la fosforilazione della timidina. Aumentando in modo significativo durante la fase S del ciclo cellulare è un affidabile marcatore di proliferazione delle cellule neoplastiche. A tutt'oggi trova la sua applicazione quasi esclusivamente in oncoematologia essendo utilizzata nella prognosi e nel monitoraggio delle malattie ematologiche maligne.

La procalcitonina (PCT) invece, è un affidabile marker d'infiammazione batterica e/o fungina. Tra tutti i marker d'infiammazione è quello che sembra fornire la migliore stima nella diagnosi, nella prognosi e nel monitoraggio delle infezioni batteriche e fungine gravi e nella sepsi anche neonatale.

Scopo del lavoro è stato quello di verificare i livelli di TK e PCT nei pazienti oncoematologici e nei donatori sani per vedere se essi erano di aiuto nella gestione del paziente. Il primo, per evidenziare i soggetti a maggior rischio di progressione e il secondo, per la verifica dei livelli basali nella popolazione ematologica e per la sorveglianza dei pazienti immunocompromessi a rischio d'infezione.

61 campioni di siero provenienti da 39 pazienti oncoematologici (20 MM, 15 LNH, 2 LLC e 2 HDG) e 22 donatori omogenei per età e per sesso sono stati prelevati e centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti. I campioni sono stati poi aliquotati e congelati. In seguito i campioni sono stati analizzati per la TK e per la PCT sull'analizzatore LIAISON® DiaSorin con i kit LIAISON® Thymidine Kinase e LIAISON® Brahms® PCT®.

I risultati suddivisi per patologia mostrano valori di PCT inferiori al limite di riferimento tranne 3 casi in cui il valore è di poco superiore al limite su cui si indagherà successivamente. I valori di TK suddivisi per patologia mostrano un netto incremento per la maggior parte dei pazienti affetti da MM, LNH, LLC e HDG.

Come atteso, il monitoraggio dei pazienti oncoematologici con l'ausilio del dosaggio della TK, ha permesso un follow-up clinico più idoneo per la terapia applicata con un notevole valore predittivo. La valutazione della procalcitonina ha invece permesso di controllare eventuali complicazioni determinate dall'immunosoppressione da terapia.

Bibliografia

Allek M et al. Leukemia and lymphoma, 1996.

182

IMMUNOREATTIVITA' E CARCINOMA RENALE

M. Beretta¹, V. Proserpio¹, C. Chinello², M. Soldi¹, N. Tiberti¹, F. Raimondo², C. Bianchi², S. Ferrero³, S. Casellato⁴, F. Magni², C. Sarto¹, P. Mocarelli¹, P. Brambilla¹

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

²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Ambientale e Biotecnologie Mediche Università Milano-Bicocca, Monza (MI)

³Servizio di Anatomia Patologica Ospedale San Paolo, Milano

⁴Istituto di Urologia, Ospedale Maggiore di Milano IRCCS, Milano

Introduzione. L'eterogeneità istopatologica e genetica, la mancanza di marcatori specifici e la chemio-radio resistenza fanno del carcinoma renale (RCC) un tumore difficile da diagnosticare precocemente e da trattare con efficacia. Sono state indagate numerose molecole implicate nel ciclo cellulare, nell'apoptosi e nell'interazione cellula-cellula, ma sfortunatamente nessuna di esse è stata ancora validata come marcatore ideale. La necessità di migliorare la qualità di vita e la sopravvivenza dei pazienti con RCC ed il riscontro di remissioni spontanee ha suggerito l'utilizzo di nuove strategie per lo studio del carcinoma renale. La tecnica SERPA (SERological Proteome Analysis) combina l'approccio sperimentale proteomico con l'analisi sierologica per identificare proteine in grado di indurre una risposta anticorpale nell'ospite [1].

Scopo. Applicare la metodica SERPA per identificare antigeni tumorali, potenzialmente utilizzabili come target terapeutici o come indicatori diagnostici o prognostici nei pazienti con carcinoma renale.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 13 pazienti affetti da RCC e sottoposti a nefrectomia presso il Policlinico di Milano. 500 µg di proteine derivanti dalle cellule epiteliali del tessuto tumorale e della corticale renale sana sono state separate con elettroforesi bidimensionale (2-D PAGE) e trasferite su membrane PVDF. L'ibridazione mediante Western Blot è stata eseguita utilizzando come anticorpo primario il siero degli stessi pazienti raccolto immediatamente prima della nefrectomia. Come controllo è stato utilizzato un pool di sieri derivanti da 6 donatori di sangue.

Risultati. L'analisi differenziale condotta con il software Image Master 2D Platinum 6.01 ha evidenziato 14 spot proteiche tumorali verso le quali solo i pazienti affetti da neoplasia sviluppano una risposta anticorpale.

Conclusioni. L'identificazione di proteine tumorali specifiche in grado di indurre una risposta immunitaria è importante per comprendere la biologia del tumore e per individuare marcatori biologici. La natura di questi biomarcatori potrebbe consentire lo sviluppo di test diagnostici rapidi e la ricerca di nuovi approcci terapeutici basati sull'utilizzo di vaccini o anticorpi monoclonali.

Bibliografia

Curr Opin Mol Ther 2002;4:216-23.

183

IL DOSAGGIO DEL CA 19.9 IN CHEMILUMINESCENZA SUL ARCHITECT ED IMMULITE NOSTRA ESPERIENZA

A. Carucci¹, S. Tundo¹, A. Legrottaglie¹, M. Pepe¹, R. Lovero¹, C. Curigliano¹, A. Convertino¹, A. Matarrese¹, E. Vinci¹

¹U.O.C. Laboratorio di Analisi di Chimica Clinica, Fasano Ostuni Cisternino (BR)

Introduzione. Il CA 19.9 è una glicoproteina ad alto peso molecolare ricca di carboidrati. Questo marcatore tumorale viene utilizzato per il monitoraggio dei pazienti affetti da neoplasie dell'apparato gastroenterico. Per il dosaggio si utilizza un anticorpo monoclonale specifico per questa Glicoproteina con metodica chemiluminescente.

Scopo del lavoro: è stato quello di valutare due strumenti Immulite (Medical System) ed Architect (Abbot) per il dosaggio del CA 19.9 con anticorpi monoclonali specifici ma differenti utilizzando la chemiluminescenza.

Materiali e metodi. Per la valutazione degli analizzatori è stato realizzato un pool di sieri di pazienti asintomatici per patologia neoplastica dell'apparato gastroenterico e con valori di CA 19.9 nei limiti. Sono stati selezionati 60 sieri di pazienti provenienti dal Day Hospital di Oncologia con diagnosi accertata di patologia neoplastica, di cui 30 in trattamento chemioterapico e 30 non in trattamento. Tutti i campioni sono stati analizzati contemporaneamente su entrambi gli strumenti. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati: la media, il CV, test t per il confronto di medie, la correlazione e la retta di regressione.

Risultati. I valori di CA 19.9 ottenuti analizzando il pool di sieri sull' Architect sono: Media 22.9, CV intra serie 8, tra serie 6. L'analizzatore Immulite ha fornito i seguenti risultati: media 22, CV intra serie 9 e tra serie 7.5, il t-test di 0.669 con $p > 0.05$, il coefficiente di correlazione è di 0.563 $R=1,025$. Per i campioni di pazienti non in trattamento i valori sono: media 789 per l' Architect e 525 per l'Immulite, il t-test è 0.255 con $p > 0.05$, il coefficiente di correlazione è di 0.95 $R=1.11$ Per i campioni in trattamento i valori sono: media 18.21 per l' Architect e 18.89 per l'Immulite il t-test è 0.75 con $p > 0.05$ ed il coefficiente di correlazione è di 0.95 $R=1.22$.

Conclusioni. L'uso di anticorpi monoclonali altamente sensibili è indispensabile per la ricerca di recidive di patologie neoplastiche. L'ottima correlazione tra i dati ottenuti sui due analizzatori ci consente di utilizzare in maniera indifferente entrambi gli strumenti. L'Architect, rispetto all'Immulite, permette il dosaggio del CA19.9 con un tempo di refertazione inferiore ed una facilità di esecuzione migliore.

184

L'APPROPRIATEZZA DELLE RICHIESTE DEI MARCATORI NEOPLASTICI NOSTRA VALUTAZIONE NELLA POPOLAZIONE FASANESE

R. Lovero¹, A. Carucci¹, S. Tundo¹, P. Ciola¹, C. Curigliano¹, A. Legrottaglie¹, M. Pepe¹, E. Vinci¹

¹U.O.C. Laboratorio di Analisi di Chimica Clinica, Fasano Ostuni Cisternino (BR)

Introduzione. I marcatori tumorali sono molecole che sono presenti, in quantità maggiore rispetto al normale, nei pazienti affetti da determinate neoplasie o da patologie benigne. Il dosaggio dei marcatori tumorali deve essere effettuato in contemporanea ad altri accertamenti poiché da solo non è sufficiente per fare diagnosi di neoplasia maligna.

Scopo del lavoro: è stato di valutare l'appropriatezza delle richieste di marcatori tumorali giunte presso il nostro laboratorio.

Materiali e metodi. Abbiamo valutato i seguenti marcatori tumorali: AFP, CEA, CA19.9, CA 15.3 CA 125, PSA. Di questi abbiamo calcolato l'incremento delle richieste dei singoli marcatori neoplastici dal 2005 a 2007. Inoltre tutte le richieste sia interne che esterne giunte al nostro laboratorio dal 01/01/2007 al 31/12/2007 sono state valutate per l'appropriatezza delle stesse. Di ogni richiesta abbiamo ricercato la diagnosi ed il numero di marcatori richiesti considerando quelle idonee solo quelle con un unico marcatore secondo le linee guida ESMO NICE, mentre non appropriate quelle con più di due marcatori.

Risultati. L'incremento percentuale annuo per singolo marcatore è: AFP 13% CEA 17% CA19.9 31% CA 15.3 15% CA 125 16% PSA 20%. Delle richieste per il PSA solo il 76% sono risultate idonee ed appropriate, il restante 24% inidonee ed inappropriate, in quanto di queste il 75% associate ad almeno un marcatore ed il restante 25% associate alla ricerca del PSA free. Per l'AFP il 68% sono idonee, il 32% sono inidonee perché associate ad almeno due marcatori tumorali. Per il CEA il 28% risultavano idonee mentre il 72% inidonee in quanto associate ad altri marcatori. Per il CA 19.9 il 42% sono idonee mentre il 58% inidonee. Per il CA 15.3 l'18% sono idonee ed l'82% inidonee, per il CA 125 il 16% sono idonee il 16% inidonee.

Conclusioni. Le richieste di marcatori neoplastici sono ormai entrati nelle routine con un continuo aumento della spesa per il laboratorio. Il significativo aumento delle richieste inappropriate provenienti dall'utenza esterna e da quella interna deve indurre il patologo clinico ad un continuo confronto sia con il clinico che, soprattutto, con il medico di medicina generale, al fine di garantire una riduzione delle richieste inappropriate ed una riduzione della spesa.

185

BIOMARCATORI MUCINICI: VALIDAZIONE DEI METODI E SPECIFICHE DI QUALITÀS. Scella¹¹S.C. Patologia Clinica, Az. Osp. C.T.O., Maria Adelaide, Torino

Introduzione. L'evoluzione tecnologica e l'analisi mirata dei dati hanno contribuito grandemente all'aumento dell'efficacia del Laboratorio nonché all'accuratezza dei risultati prodotti.

Obiettivo del nostro studio è la validazione dei dosaggi dei biomarcatori oncologici, con particolare riferimento alle mucine, attraverso un processo di analisi approfondita dei parametri legati alle caratteristiche del metodo, alla variabilità biologica ed alle specifiche di qualità.

Materiali e metodi. Sistema analitico AIA 1800 LAS con principio fluoroenzimatico, reattivi ST-AIA-PACK. Calcolo dei valori sperimentali su serie di controlli a tre livelli di concentrazione elaborati con i dati riepilogativi VEQ. Confronto tra i dati sperimentali e le specifiche di qualità in base alla variabilità biologica.

Risultati. CV% analitico - CA15.3:4.59%;CA125:5.91%; CA19.9: 6.50%,B% analitico - CA15.3: 0.00%; CA125: 3.60%, CA19.9: 2.70%

TE% analitico - CA15.3: 7.58%; CA125: 13.35%; CA19.9: 13.42%, CV% desiderabile - CA15.3: 3.10%; CA125: 14.60%; CA19.9: 8.00%

B% desiderabile - CA15.3: 15.8%; CA125: 14.10%; CA19.9: 2.80%, TE% desiderabile - CA15.3: 20.90%; CA125: 38.20%, CA19.9: 39.00%

CV% stato arte - CA15.3: 9.00%; CA125: 9.00%; CA19.9: 9.00%.

Conclusioni. Le necessarie garanzie di affidabilità delle analisi valutate sono testimoniate dai traguardi analitici ampiamente raggiunto per tutti i parametri presi in considerazione raggiungendo e superando le soglie ottimali per CA15.3, CA125, CA19.9. Anche i limiti imposti dai CV definiti dallo <<stato dell'arte>> della VEQ sono ampiamente rispettati.

Bibliografia

1. Mercuri A, Chiesa MR, Conte R, Giovannini S, Zucchelli GC, Pilo A. Variabilità "Stato dell'arte" dei saggi immunometrici: dati dei programmi EQAS-CNR 2007.
2. Fraser CG. Biological variation from principles to practice. Biomedica Source Books, 2004 (Ed. Ital.)
3. Price CP, Christensen RH. Evidence-Based Medicine from principles to outcomes. Biomedica Source Books, 2005 (Ed. Ital.)

186

PRELIMINARY EVALUATION OF HUMAN EPIDIDYMIS PROTEIN 4 (HE4) IN PATIENTS WITH A PELVIC MASS

M. Montagnana¹, O. Ruzzenente¹, V. Bresciani², S. Scevarolli², S. Giudici², A.M. Minicozzi³, E. Danese¹, G.L. Salvagno¹, M. Franchi², C. Cordiano³, G.C. Guidi¹, G. Lippi¹

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

²Unità di Ostetricia, Dip. Materno ed Infantile, Osp. GB Rossi, Verona

³Sez. di Chirurgia d'Urgenza, Dip. di Scienze Anestesiologiche e Chirurgiche Specialistiche, Università degli Studi di Verona

Aim. Although CA125 is the most widely used cancer marker in the diagnostic follow up of pelvic tumour in women, its clinical usefulness for the screening is very limited, because it is frequently elevated in women with more highly prevalent benign disease. The WFDC2 (HE4) gene is amplified in ovarian carcinomas, whereas its expression in normal tissues, including ovary, is low. Less often, HE4 results positive in gastrointestinal cancer. The objectives of this study were to assess the tumour marker levels of both HE4 and CA125 in patients with different forms of benign and malignant pelvic masses, as well as in patients with colon carcinoma.

Methods. The preliminary study population included 60 patients with pelvic mass: ovary cancer (n=22), endometrial carcinoma (n=22) and benign ovary mass (n=16). 12 control subjects, matched for sex and age were also included in the study. In patients, blood samples were collected from patients the day before surgery in vacuum tubes containing no additives. Serum levels of HE4 was determined using an ELISA kit developed by Fujirebio Diagnostic, Inc., performed according to the manufacturer's specifications.

Results. The median CA125 and HE4 serum levels were significantly higher in all ovarian cancer relative to both the healthy subjects (CA125: 458.9 vs. 10.1 U/mL, p<0.001; HE4: 394.7 vs. 17.3 pmol/L, p<0.001) and the ovary benign mass (CA125: 458.9 vs. 55.9 U/mL, p=0.010; HE4: 394.7 vs. 43.4 pmol/L, p<0.001). CA125 and HE4 values were also statistically higher in ovary cancer as compared with endometrial (CA125: 458.9 vs. 11.66 U/mL, p<0.001; HE4: 394.7 vs. 62.27 pmol/L, p=0.002) and colon cancers (CA125: 458.9 vs. 8.93 U/mL, p=0.0003; HE4: 394.7 vs. 63.35 pmol/L, p=0.012). The analysis of the diagnostic performances on healthy controls and patients with ovarian cancers, revealed that HE4 had a significantly higher ROC-AUC when compared with CA125. For CA125, using a cut-off level of 37 U/mL, the sensibility was 82% and the specificity was 100% (p<0.0001). For HE4, using a cut-off level of 30 pmol/L, the sensitivity was 96% and the specificity 100% (p<0.0001).

Conclusions. The results of our investigation reveal that HE4 is a promising cancer marker, especially in the complex differential diagnosis of gynaecological malignancies.

187

CIRCULATING HTERT DNA IN EARLY BREAST CANCER PATIENTS

R. Divella¹, R. Lacalamita¹, A. Daniele¹, I. Abbate¹, V.M. Garrisi¹, G. Simone¹, A. Paradiso¹, M. Quaranta¹, S. Tommasi¹

¹IRCCS Istituto Tumori Giovanni Paolo II, Dip. Oncologia Sperimentale, Bari

Background. Breast cancer (BC) is a leading cause of malignancy in women. 35-40% of patients with operable breast cancer develop metastases after primary therapy. However, current screening methods fail to completely predict recurrency. Thus, a non invasive test for early detection of the disease and for monitoring disease progression could be a goal for many researchers. Yet blood, the only fluid in direct contact with all bodily organs, remains the most attractive for cancer detection. Increased concentrations of cell-free DNA in plasma or serum have been found in patients with different types of cancer but not in healthy individuals. In particular, the amount of hTERT gene in plasma has been suggest as a marker of tumor presence/aggressiveness for many type of cancer¹. Aim of our study was to quantify the amount of the hTERT gene in plasma of patients with primary breast cancer and to test its correlation with clinical paramete women rs of disease. **Methods:** 121 BC patients, 30 patients with fibroadenoma (NBC) and 50 healthy were enrolled. DNA was extracted from 200 ml of plasma and hTERT was analyzed by real time PCR.

Results. The amount of hTERT in plasma was significantly different ($p < 0.01$) in BC (0.98 ± 0.94 ng/ μ l), NBC (0.55 ± 0.25 ng/ μ l) and controls (0.03 ± 0.09 ng/ μ l) and showed a sensitivity of 50% and specificity of 90% in detecting malignancy. Circulating hTERT DNA resulted significantly higher in ER+/PgR+ patients (1.00 ± 0.84 ng/ μ l) with respect to ER-/PgR- patients (0.48 ± 0.42 ng/ μ l), $p = 0.03$. Furthermore, a direct correlation was present between hTERT levels and HER-2/neu expression: score 0-1 (0.70 ± 0.43 ng/ μ l) vs score 2+ (1.18 ± 0.67 ng/ μ l), $p = 0.01$, and vs score 3+ (1.24 ± 0.42 ng/ μ l), $p = 0.02$. Moreover, circulating hTERT DNA levels resulted inversely correlated with serum CA 15.3 concentrations (Pearson correlation = -0.2, $p = 0.006$).

Conclusions. Circulating DNA markers offer the promise of precise quantitative analysis without the need to establish difficult cutoffs as in necessary for protein markers.

Reference

1. Divella R, Lacalamita R, Tommasi S, et al. PAI-1, t-PA and Circulating hTERT DNA as Related to Virus Infection in Liver Carcinogenesis. *Anticancer Research* 2008;28:223-8.

188

GENE EXPRESSION OF LAMININ-5(LN-5) IN PERITONEAL LAVAGE FROM PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER. PRELIMINARY STUDY

G. D'Elia¹, A. Volpi¹, O. Pannarale¹, A. Panebianco¹, M. Lospalluti¹, A. Kavvadias¹, P. Ialongo¹, F. De Gennaro¹, M. De Luca¹, M. Rosito¹, N. Palasciano¹

¹3rd General Surgery Unit, Dept. of Emergency and Organ Transplantation, University of Bari, Italy

Aim. To detect expression of LN-5 in peritoneal lavage from colorectal cancer, utilizing reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), in pts without evidence of peritoneal carcinosis and metastatic diffusion.

Background. Surgical resection in colorectal cancer is the best treatment and can improve long-term disease-free survival. Unfortunately, even after curative surgery the pts may develop metastasis. Tumor invasion and diffusion are a various process and the crossing of the basement membrane (BM) by cancer cells is one of the most important step. LN-5(component of BM), is a heterotrimeric glycosylated protein, formed by $\alpha 3$ -#3-#2, produced by 3 different genes(LAMA3/LAMB3/LAMC2). LN5 anchors epithelial cells to the BM: an interaction between cancer cells and laminin is an important factor in tumor invasion and metastasis.

Patients and methods. After laparotomy/laparoscopy the abdominal cavity was filled with 200ml of isotonic solution before and at the end of the operation: 50 ml of peritoneal lavage fluid was collected to make cytology and RT-PCR assay. Pre and post-operative lavage from 26 pts with colorectal cancer and 10 control pts were analyzed by cytological examination. A semiquantitative RT-PCR was used to detect the expression levels of $\alpha 3$ -#3-#2 chains of LN-5, with primers specific.

Results. Pre/postoperative cytology are negative in all control pts and in cancer group. Gene expression for LAMA3, LAMB3 and LAMC2 were positive in preoperative lavage in 15.38% (4/26 pts), 19.23% (5/26 pts) and 42.3%(11/26 pts) respectively and in the postoperative washing in 42.3% (11/26 pts), 46.15% (12/26 pts) and 69.23% (18/26 pts) respectively. In all cancer pts in postoperative lavage was found, at least, one of the 3 genes. All control. pts were negatives.

Conclusions. The expression of LN5gene could be considered a tumor marker useful to detect free peritoneal colorectal cancer cells, but all must be validated by a large number of pts and follow-up.

References

1. Identification of Early-Stage Colorectal Cancer Patients at Risk of Relapse Post-Resection by Immunobead Reverse Transcription-PCR Analysis of Peritoneal Lavage Fluid for Malignant Cells Lloyd JM *Clinical Cancer Research* 2006;12:417-23.
2. The Laminins Malinda KM et al. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:957-95.

189

ENUMERATION OF CIRCULATING TUMOUR CELLS (CTC) IN WHOLE BLOOD BY THE VERIDEX CELLSEARCH SYSTEM AS AN ADJUNCT TO ROUTINE CLINICAL EVALUATION OF THE PATIENT CONDITION IN METASTATIC BREAST CANCER

L. Aimati¹, M. Borro¹, M. Torre¹, O. De Luca¹, A. Provenza¹, A. De Blasi¹, I. Paris², P. Marchetti², M. Simmaco¹

¹Dipartimento Scienze Biochimiche, UO Diagnostica Molecolare Avanzata (DiMA), Roma

²UO Oncologia, II Facoltà di Medicina, Università La Sapienza, Roma

Introduction. Cancer metastasis occurs when cells shed from the primary tumor, enter the circulation, and begin to grow in distant locations of the body. Carcinomas are derived from epithelial cells that are not normally found in circulation (1). The presence of CTC in the peripheral blood, as detected by the CellSearch System (Veridex LLC, NJ, USA) has been associated with decreased progression free survival and decreased overall survival in patients treated for metastatic breast cancer. A CTC count of 5 or more per 7.5 mL of blood at any time during the course of the disease is predictive of shorter progression free survival and overall survival.

Materials and Methods. Peripheral blood is collected in CellSave tubes (Immunicon Corporation, PA, USA), designed to preserve integrity of CTC for up to 72 hours at room temperature (15 to 30°C) prior to processing. Blood sample (7.5 ml) is analyzed with the CellSearch#Circulating Tumour Cell Kit, containing reagent for the immunomagnetic labelling and staining of CTC, using the CellTracks#AutoPrep##System, which allows automation and standardization of sample preparation. Isolated CTC are dispensed in a cartridge and enumerated by a semiautomatic fluorescence microscope, the CellTracks#Analyzer II.

Results. Evaluation of CTC presence in whole blood of breast cancer patients is currently active, supported by research grants, in our laboratory. This analyses is used in adjunction to other clinical methods to monitor the patient status and response to therapy and results useful to better plan the clinical managing of the patient (therapy efficacy, periods of therapy suspension, timing of imaging).

References

1. Cancer Biology, 3 edition, Ray Ruddon 1995.

190

QUANTITATIVE ANALYSIS OF NNMT mRNA EXPRESSION IN URINE AND TUMOR TISSUE OF BLADDER CANCER PATIENTS AND ITS POTENTIAL RELEVANCE FOR DISEASE DETECTION

V. Rossi¹, G. Muzzonigro², G. Milanese², V. Pozzi¹, D. Sartini¹, M. Emanuelli¹

¹Istituto di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

²Istituto di Scienze Materno-Infantili, Cattedra di Clinica Urologica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Carcinoma of urinary bladder ranks among the top ten most common cancers worldwide and the majority of these tumours recur and progress into muscle-invasive disease, thus needing for long-term and frequent follow-up. Despite its invasive nature, cystoscopy remains the gold standard diagnostic evaluation for detection and surveillance of bladder cancer. Urinary cytology is used as an adjunct to this procedure, but lacks sensitivity for low-grade tumours. More sensitive and non invasive methods are therefore required, what fosters continuing interest in identifying new bladder cancer markers.

To explore the involvement of enzymes of drug transport, phase I metabolism, and phase II metabolism in bladder cancer, in the present study we analysed the gene expression profiles of tumour and non-tumour tissues obtained from the same patient by DNA macroarray. The enzyme Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) ¹ was identified as a highly expressed gene in bladder cancer. Real-Time PCR, Western blot analysis, and catalytic activity assay performed on a large cohort of patients with transitional cell carcinoma (TCC) confirmed NNMT upregulation. Differential specific activity measurements (tumour versus adjacent normal tissue/ carcinoma in situ) revealed NNMT overexpression in all TCCs, with fold change values ranging between 1.3 and 383.2 (mean 49.4-fold).

NNMT mRNA levels were also determined in urine specimens obtained from 20 patients with bladder TCC and 20 healthy subjects. We found that NNMT expression levels were significantly higher in patients with bladder tumour compared to controls, that showed very low or undetectable amounts of NNMT transcript.

Our experimental data indicate that a marked NNMT increase is a peculiar feature of TCC and suggest the potential suitability of urine NNMT expression levels determination for the diagnosis of bladder cancer.

Reference

1. Sartini D et al. J Urol 2006;176(5):248-54.

191

NICOTINAMIDE N-METHYLTRANSFERASE AS POTENTIAL PREDICTOR OF LYMPH NODE METASTASIS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

V. Rossi¹, D. Sartini¹, A. Santarelli², R. Rocchetti², M. Tomasetti³, V. Pozzi¹, A. Stronati⁴, L. Lo Muzio⁵, M. Emanuelli¹

¹*Ist. di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

²*Ist. di Scienze Odontostomatologiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

³*Dip. di Patologia Molecolare e Terapie Innovative, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

⁴*Ist. di Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

⁵*Dip. di Scienze Chirurgiche, Università di Foggia, Foggia*

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most frequent malignant tumour of the oral cavity, but little is known about the molecular mechanisms deciding on this malignancy. Comprehensive gene expression profiling is essential for the identification of reliable and clinically applicable markers, which allow the preoperative detection of cervical lymph node metastases. In fact, their early detection and optimal management is very important to improve survival. 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 analysed the enzyme expression in paired tumour and non-tumour tissues obtained at surgery by RT-PCR, Real-Time PCR, western blot and immunohistochemical analyses. 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 +)¹. To observe the effect of NNMT silencing on cell proliferation and cell cycle distribution, four shRNA plasmid vectors against NNMT were transfected into human oral cancer cell line PE/CA-PJ15. NNMT down-regulation was detected by Real-Time PCR and western blot. The cell proliferation inhibition was determined by MTT and soft agar colony formation assays; cell cycle distribution and apoptosis were examined by flow cytometry. ShRNA vectors targeted against NNMT efficiently suppressed gene expression, showing expression inhibition rates around 70 % either at the mRNA or at the protein level. The shRNA-mediated gene silencing of NNMT resulted in a significant rise in apoptosis rate. The observations above reported support the hypothesis that the enzyme plays a role in tumour expansion, and NNMT expression level measurements would provide a rapid and useful method of identifying patients at high risk of lymph node metastases. Therefore, NNMT may have potential as a new prognostic marker, and its inhibition could represent a possible molecular approach to the treatment of OSCC.

Reference

1. Sartini D et al. Mol Med 2007;13:415-21.

192

IL PROGRAMMA DI SCREENING DEL TUMORE DEL COLON RETTO DELL'USLL 9 DI TREVISO MEDIANTE ESAME DI RICERCA DEL SANGUE OCCOLTO NELLE FECI

M. Siculi¹, M. Pieno²

¹*Lab. Analisi Chimico-Cliniche, ULSS 9 "Ca' Foncello", Treviso*

²*Segreteria Organizzativa Screening Oncologici, Dipartimento di Prevenzione ULSS 9, Treviso*

Scopi/obiettivi. Numerosi studi riconoscono nella ricerca del sangue occulto fecale un metodo di screening efficace nella prevenzione del cancro del colon retto.

Dal 27 settembre 2006 anche l'ULSS di Treviso si è attivata per realizzare tale programma.

Metodologia. La popolazione target è costituita da soggetti con età compresa fra 50 e 69 anni.

Il modello organizzativo prevede un'informazione capillare in ogni comune della provincia con riunioni con MMG e farmacisti (a livello distrettuale), con associazioni di volontariato locali e conferenza per la popolazione con invito individuale da parte del sindaco a livello comunale, locandine e opuscoli informativi distribuiti su tutto il territorio. L'intera popolazione bersaglio viene invitata secondo un criterio territoriale con una lettera contenente un'etichetta con codice a barre identificativo e l'indicazione di rivolgersi ad una farmacia del proprio comune per ritirare il kit diagnostico e le modalità di riconsegna.

Il test utilizzato è un test immunoturbidimetrico al latice per la determinazione quantitativa dell'emoglobina umana nelle feci su strumento dedicato OC-Sensor micro (Alfa Wassermann).

Risultati. Dal 27/09/06 al 31/05/08 sono state invitate 62845 persone, hanno risposto in 43937, con un'adesione grezza del 72.1% ed un'adesione corretta del 73.7%. I positivi al test sono stati 2667 (6.0%). I test non valutabili per inadeguatezza del campione sono 227 (0.514%).

Conclusioni. La praticabilità dello screening, la capillarità della comunicazione, la disponibilità di tutte le figure professionali coinvolte e la partecipazione della comunità hanno portato a conseguire un'alta adesione al programma.

Bibliografia

Registro tumori PD.

193

HPLC-MASS SPECTROMETRY METHOD FOR QUANTITATIVE DETECTION OF NEUROENDOCRINE TUMOR MARKERS: VANILLYLMANDelic ACID, HOMOVANILLIC ACID AND 5-HYDROXYINDOLEACETIC ACID

L. Lionetto¹, A.M. Lostia¹, M. Torre¹, O. De Luca¹, L. Aimati¹, M. Borro¹, G. Gentile¹, A. Provenza¹, M. Simmaco¹

¹Dipartimento Scienze Biochimiche, UO Diagnostica Molecolare Avanzata (DiMA), Il Facoltà di Medicina, Università La Sapienza, Roma

Background and Aim. The urinary excretion of vanillyl-mandelic acid (VMA), homovanillic acid (HVA) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) can be increased in the presence of neuroblastic and carcinoid tumors. The former are characterized by defective catecholamine metabolism which results in high urinary levels of VMA and HVA. The latter show an altered metabolism of tryptophan and an increased synthesis of serotonin, producing high 5-HIAA urinary concentrations.

Materials and Methods. We describe an HPLC-tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantification of VMA, HVA and 5-HIAA in human urine. The chromatographic separation is performed on a reversed-phase C18 column. Instrumental analysis is performed on a Q-Trap 2000 triple quadrupole/ion trap mass spectrometer. Results. The method is fast and does not require sample pre-treatment. Multiple calibration curve exhibited consistent linearity and reproducibility. Linear responses were observed in the concentration range 0-50 mg/l for each analyte. Limits of detection were 0.001 mg/l for VMA, 0.015 mg/l for 5-HIAA and 0.050 mg/l for HVA with a signal-to-noise ratio of 3. Limits of quantification were 0.005 mg/l for VMA, 0.050 mg/l for 5-HIAA and 0.1 mg/l for HVA with a signal-to-noise ratio of 10.

Conclusions. The liquid chromatography-tandem MS method described presents the feature of being rapid, selective and sensitive. It does not imply sample derivatization, necessary in gas-chromatographic methods, but a simple dilution of the sample with the IS mixture. The HPLC separation, which is completed in 6 min inclusive of column re-equilibration, allows processing a large number of samples per day using the automatic injector. Chromatographic separation on a Luna C18 column i) provides sufficient specificity, ii) prevents ion suppression and iii) allows selective detection of VMA, HVA and 5-HIAA. Moreover, the possible co-elution of some metabolites with either physio-pathologic compounds or drugs that can hamper correct quantitative measurement is overcome by the MS/MS analysis. The MS/MS analysis is highly specific, in that it relies on the monitoring of two unique ion fragments for each metabolite. The possibility to estimate these metabolites within a single analysis under uniform assay conditions widens the diagnostic perspectives for neuroendocrine tumors, carcinoid syndrome, as well as for several pathologies such as brain function disturbance.

194

PLASMA NEFA VARIATIONS INDUCED BY THREE DIFFERENT SHORT-TERM EXERCISES

S. Masini¹, A. Buglione², R. Colli², S. D'Ottavio², G. Fucci¹, K. Piccoli¹, R. Massoud¹, G. Federici¹, S. Bernardini¹

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, PTV, Roma

²Dip. di Scienze dello Sport, Università di Tor Vergata, Roma

A training program is essential in the weight-reduction programmes because it is one of the factors that determine long-term weight maintenance. During exercise increased energy requirement is satisfied by the activation of human muscle metabolism and, consequently, the release of Non Esterified Fatty Acids (NEFA) from adipose tissue.

The aim of this study was to monitor the variations of NEFA concentration and other biochemical parameters involved in fat metabolism (creatine kinase (CK), glucose, growth hormone (GH), insulin, urinary epinephrine/creatinine and norepinephrine/creatinine ratios, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), triglycerides, adiponectin and NEFA concentrations) on peripheral blood/urine samples, before and after three different short-term exercises of about one hour and with a moderate to vigorous intensity: 1) submaximal repetition running exercise preceded by sets of weight loaded squat 2) Yo-Yo intermittent exercise 3) submaximal repetition running trial only. Mechanic parameters (mean muscular strength, max muscular strength, high of jump and force/time ratio) were also measured before and after the exercises with a squat jump test. The t-student's paired test was performed to compare the mean values \pm standard error of mechanic and biochemical parameters pre and post each protocol. All mechanic parameters showed a trend towards an increase after each exercise.

A significantly increase in plasma NEFA concentration was evidenced in all exercises except in Yo-Yo intermittent trial. Blood GH and CK concentrations as well as Urinary Epi/Creatinine and NE/Creatinine ratios increase in all the training protocol even if in a different way and insulin concentration decrease. No changes were found for adiponectin, cholesterol, glucose and urinary creatinine concentrations.

Our data seem to suggest that the protocols enhance lipolysis and endocrine activities, but only submaximal exercise, alone or in combination with resistance trial, increase significantly plasma NEFA levels being more effective in the reduction of body weight than Yo-Yo intermittent exercise.

195

ASSOCIATION OF RECREATIONAL PHYSICAL ACTIVITY WITH TPA AND PAI-1 IN YOUNG WOMEN

M. Di Santolo¹, G. Stel², S. Cauci¹

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Facoltà di Medicina, Università di Udine

²Dipartimento di Patologia e Medicina Sperimentale e Clinica, Facoltà di Medicina, Università di Udine

Background. The endogenous fibrinolytic system plays a critical role in maintaining vascular patency. We aimed to assess modulation of venous tissue-type plasminogen activator (tPA), and plasminogen activator inhibitor (PAI-1), two fibrinolytic biomarkers implicated in coronary heart disease (CHD) risk, by recreational physical activity in young healthy non-obese women.

Methods. In a case-control study, 97 healthy white Italian women (aged 22.4#5.78 years, body mass index (BMI) 22.0#2.81 kg/m²) were analyzed; 32 were recreational athletes performing 8.2±2.32 h/week exercise and 65 were sedentary controls. Venous tPA and PAI-1 antigen were measured in fasting subjects.

Results. Cross-sectional analyses revealed significant differences in median tPA but not PAI-1 concentrations between recreational athletes and sedentary women. We observed that the use of hormonal contraception significantly affected both tPA and PAI-1. Thus, in a secondary analysis 77 women without hormonal contraception were examined. Continuous tPA and PAI-1 were not correlated with age, BMI and smoking. tPA antigen was inversely related to hours/week exercise (P=0.005), whereas PAI-1 tended to be inversely associated to hours of exercise (P=0.05).

Conclusion. The profile of cardiovascular risk markers in young non-professional athletes is poorly explored. Recreational physical exercise reduces the concentrations of tPA and tend to decrease PAI-1. Among young normal-weight women, beneficial effects of recreational physical activity on cardiovascular risk can be mediated by reduced tPA, this could reflect a reduced thrombotic potential.

196

PREVALENCE OF ANEMIA AND IRON DEFICIT IN RECREATIONAL YOUNG FEMALE ATHLETES AND SEDENTARY WOMEN

M. Di Santolo¹, G. Stel², G. Banfi³, F. Gonano², S. Cauci¹

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

²Dept. Experimental and Clinical Pathology and Medicine, School of Medicine, Univ. Udine, Udine, Italy

³IRCCS Galeazzi Institute and School of Medicine, Univ. Milan, Milan, Italy

Purpose. We aimed to evaluate the effects of regular physical exercise on iron status in a population of young healthy menstruating women, and to compare the frequency of anemia and iron deficit (ID) in athletes and sedentary controls.

Methods. A total of 191 healthy white Italian women (23.5 ± 4.68 years) were analyzed; 70 were non-professional athletes performing 11.1 ± 2.63 h week⁻¹ exercise and 121 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), soluble transferrin receptor (sTfR), and the sTfR/log ferritin ratio (sTfR-F index) – were evaluated. Anemia threshold was Hb <120 g/l. Ferritin concentrations <12 #g/l were considered as ID.

Results. Frequency of anemia (15.7% vs 10.7%, P = 0.32), ID (27.1% vs 29.8%, P = 0.70), and ID anemia (8.6% vs 5.8%, P = 0.46) was not different in athletes and controls. However athletes were 3-fold more likely than controls (17.1% vs 5.8%) to have serum iron <50 µg/dl (odds ratio (OR) 3.37, P = 0.012). Low TfS <15% was found in 25.7% of athletes and in 13.2% of controls, OR 2.27, P = 0.030. Elevated sTfR >1.76 mg/l was found in 24.3% of athletes and in 12.4% of controls, OR 2.27, P = 0.034.

Conclusion. Our study documented an altered iron status in recreational athletes, but did not find negative effects of exercise on iron stores and Hb concentrations in young female athletes. We found that almost a fifth of athletes have anemia and a third have iron deficiency, as these conditions are detrimental to physical activity, recreational athletes should be monitored for alterations of iron status.

Reference

Di Santolo M, Stel G, Banfi G, Gonano F, Cauci S. Anemia and iron status in young fertile non-professional female athletes. *Eur J Appl Physiol* 2008;102:703-9.

197

INFLUENCE OF CHRONIC PHYSICAL EXERCISE OF MORNING SERUM PROLACTIN LEVELS

G. Lippi¹, F. De Vita², G.L. Salvagno¹, M. Montagnana¹, M. Gelati¹, G.C. Guidi¹

¹*Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona, Italy*

²*A.C. Chievo Verona, Verona, Italy*

Background. There is little information on the influence of chronic physical exercise on baseline prolactin levels in male athletes, especially in professional soccer players.

Methods. Serum prolactin was measured in 31 members of the Chievo-Verona professional soccer team playing in the Italian major league ("Serie A"), and in a control population of 195 healthy, sedentary, male blood donors. Athletes had rested 24 hrs from the previous training session. All samples were collected in the morning after an overnight fast and a minimum of 30 min rest before venipuncture.

Results. No significant differences could be observed in the morning concentration of serum prolactin between athletes and sedentary controls (12.9 ± 1.0 versus 11.8 ± 0.8 ng/mL; $p=0.471$). The percentage of athletes displaying values outside the age- and sex-specific reference range did not differ significantly from that of the control populations (<3.4 ng/mL: 0 versus 1%, $p=0.642$; >16.2 ng/mL: 29 versus 23%, $p=0.154$).

Conclusions. Results of our investigation show that the baseline (morning) concentration of serum prolactin might not vary significantly in response to chronic physical exercise. Therefore, the reference range for the general population of young male adults might be also used in professional soccer players and, probably, in other sportsmen with a similar physical workload.

198

BALANCE BETWEEN CIRCULATING ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS (EPCs) AND MATURE CIRCULATING ENDOTHELIAL CELLS (CECs) IN RELATION TO THE SEVERITY OF PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE

F. Cesari¹, A. Gori¹, R. Caporale², G. Messeri², M. Di Mare³, G. Pratesi³, C. Pratesi³, R. Pulli³, G.F. Gensini¹, R. Abbate¹

¹*Department of Medical and Surgical Critical Care, Thrombosis Centre, University of Florence*

²*Central Laboratory, Azienda Ospedaliero- Universitaria Careggi, Florence*

³*Unit of Vascular Surgery, University of Florence, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence*

Introduction. The maintenance of endothelial health depends, not only on the local milieu, but also on circulating endothelial progenitor cells (EPCs) derived from the bone marrow. Indeed, EPCs support the integrity of vascular endothelium and promote revascularization of ischemic areas. On the other hand, circulating mature endothelial cells (CECs) are considered a marker of endothelial injury. Previous studies demonstrated reduced number of EPCs in peripheral arterial disease (PAD) patients, but few data are available on CECs. Aim of our study was to contemporarily assess EPCs and CECs in PAD patients in relation to the severity of the disease.

Methods. In 30 PAD patients [22 M/ 8 F; median age: 69 (45-86) years] we measured circulating EPCs and CECs by using flow cytometry. EPCs were defined as CD34+KDR+, CD133+KDR+ and CD34+CD133+KDR+, while CECs were defined as CD146+/CD31+/CD45-/CD61-.

Results. A significant trend of decrease ($p<0.05$) in relation to the clinical severity of the disease, as seen by Fontaine's stages, was observed for CD133+/KDR+ EPCs [stage IIa: 0.093 (0.06-0.25); stage IIb: 0.049 (0.02-0.16); stage III: 0.03 (0.02-0.05); stage IV: 0.035 (0.02-0.08) cells/#L]. On the contrary, a significant ($p<0.05$) increase was showed by CECs [stage IIa: 0.077 (0.02-0.13); stage IIb: 0.084 (0.02-0.19); stage III: 0.15 (0.05-0.19); stage IV: 0.22 (0.08-0.33) cells/#L]. In order to evaluate the balance existing between EPCs and CECs in relation to the clinical progression of the disease, we calculated the CECs/EPCs ratio. By increasing Fontaine's stage, a progressive and significant ($p<0.05$) increase in ratio value was observed, indicating a prominent role of CECs with respect to EPCs number [stage IIa: 0.62 (0.2-2.30); stage IIb: 1.22 (0.23-7.67); stage III: 6.39 (1.43-7.71); stage IV: 6.14 (1-16)].

Conclusions. Our results demonstrate an unbalance between EPCs and CECs in PAD patients in relation to the progression of the disease, possibly indicating that the endothelial damage observed in these patients is not sufficiently repaired by a concomitant increase of the regenerative capacity of EPCs.

199

DIFFERENT PATTERN OF MODIFICATIONS FOR HAEMATOPOIETIC AND ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS AFTER A STRENUOUS EXERCISE IN SEDENTARY HEALTHY MEN

F. Cesari¹, F. Sofi¹, A. Capalbo², N. Pucci², R. Caporale³, G. Messeri³, A. Gori¹, S. Califano², G. Gensini¹, R. Abbate¹

¹Department of Medical and Surgical Critical Care, Thrombosis Centre, University of Florence, Italy

²Institute of Sport Medicine, Florence, Italy

³Central Laboratory, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Florence, Italy

Introduction. Physical exercise has been reported to increase the number of circulating haematopoietic (HPCs) and endothelial progenitors cells (EPCs) in athletes and in moderately-trained subjects, but no data on the effect of exercise on the mobilisation of these cells in sedentary subjects are available. The aim of this study was to assess the effect of a maximal exercise test on HPCs and EPCs in a group of healthy sedentary men.

Methods. Twenty men with a median age of 34 (range: 22-40) years underwent to a maximal incremented graded treadmill test. The number of HPCs and EPCs were determined pre-exercise (T0), immediately at the end of the exercise test (T1) and 30 minutes after (T2). Peripheral blood HPCs were defined as CD34+, CD133+ and CD34+/CD133+ while EPCs were defined as CD34+KDR+, CD133+KDR+ and CD34+CD133+KDR+ by flow cytometry.

Results. HPCs showed a pattern of modification that included a significant ($p < 0.05$) increase (CD34+: 4.31 ± 3.1 vs. 3.14 ± 1.7 ; CD133+: 4.3 ± 3.1 vs. 3.1 ± 1.6 ; CD34+/CD133+: 4.3 ± 3.2 vs. 3.1 ± 1.8 cells/ μ L, for T1 and T0, respectively) for all the three types at T1, with a following significant decrease at T2 (CD34+: 2.9 ± 1.7 ; CD133+: 2.9 ± 1.7 ; CD34+/CD133+: 2.9 ± 1.7 cells/ μ L; $p = 0.002$). On the contrary, EPCs reported a specular pattern of modifications with a significant decrease immediately after the acute exercise (CD34+/KDR+: 0.06 ± 0.04 vs. 0.08 ± 0.06 , $p = 0.04$; CD133+/KDR+: 0.07 ± 0.05 vs. 0.09 ± 0.04 , $p = 0.02$; CD34+/CD133+/KDR+: 0.06 ± 0.05 vs. 0.08 ± 0.04 , $p = 0.04$ for T1 and T0 respectively), and a subsequent increase at T2, 30 minutes after the exercise (CD34+/KDR+: 0.08 ± 0.05 ; CD133+/KDR+: 0.09 ± 0.06 ; CD34+/CD133+/KDR+: 0.08 ± 0.05 cells/ μ L).

Conclusion. In conclusion, we documented that intensive physical exercise has different effects in modifying HPCs' and EPCs' circulating levels. In fact, while HPCs significantly augmented immediately after the acute exercise, probably due to the increase of the leukocyte turn-over, EPCs showed a significant decrease with respect to baseline, possibly determined by the release of inflammatory mediators that are highly produced during the acute phase of the exercise.

200

ASSOCIATION OF RECREATIONAL PHYSICAL ACTIVITY WITH HOMOCYSTEINE, FOLATE AND LIPID MARKERS IN YOUNG WOMEN

M. Di Santolo¹, G. Banfi², G. Stel³, S. Cauci¹

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

²IRCCS Galeazzi Institute, and School of Medicine, University of Milan, Milan, Italy

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

Purpose. Homocysteine is an emerging cardiovascular disease (CVD) risk marker, we assessed modulation of homocysteine by recreational physical activity in young healthy women.

Methods. Participants were 240 healthy white Italian women (aged 23.4 ± 4.53 years, body mass index (BMI) 20.8 ± 1.97 kg/m²); 124 were recreational athletes performing 8.7 ± 2.46 h/week exercise and 116 were sedentary controls. Blood homocysteine, folate, creatinine, and lipid markers – triglycerides, total cholesterol, low-density (LDL) and high-density (HDL) lipoprotein cholesterol – were evaluated.

Results. Cross-sectional analyses revealed no significant differences in median homocysteine, folate and lipid markers between athletes and controls. Frequency of elevated homocysteine levels at CVD risk #12.0 μ mol/L and #15.0 μ mol/L were not different between athletes and controls. Continuous homocysteine was inversely related to folate ($P < 0.001$), and positively associated with age ($P = 0.009$) and creatinine ($P = 0.033$). Homocysteine was not associated with hours of exercise, BMI, and lipid markers. Women with folate depletion (< 3.0 μ g/L) were 2.5-fold and 4.5-fold more likely to have homocysteine #12.0 and #15.0 μ mol/L, respectively. Also, folate levels < 5.0 μ g/L were associated with 2.5-fold higher frequency of homocysteine #12.0 μ mol/L.

Conclusion. Recreational physical exercise does not adversely impact homocysteine levels among young non-obese women. However, low folate increases the risk for elevated homocysteine. Consequently, increased folate intake should be recommended to young women with elevated homocysteine.

Reference

Cauci S, Di Santolo M, Culhane JF, Stel G, Gonano F, Guaschino S. Effects of third-generation oral contraceptives on high-sensitivity C-reactive protein and homocysteine in young women. *Obstet Gynecol* 2008;4:857-64.

201

LA CISTATINA C COME MARKER PRECOCE DI INSUFFICIENZA RENALE IN PAZIENTI PEDIATRICI CON DIABETE DI TIPO I: NOSTRA ESPERIENZAI. Cataldo¹, M.R. Flacco¹, T. Sacco¹, C. Romano¹¹Lab. di Patologia Clinica I, Osp. SS. Annunziata, Chieti

La Cistatina C è una proteina a basso peso molecolare che viene liberamente filtrata a livello del glomerulo per essere quasi completamente riassorbita e catabolizzata dalle cellule del tubulo contorto prossimale e per questa sua caratteristica viene utilizzata come marcatore biochimico endogeno di filtrazione glomerulare. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'utilità del dosaggio della Cistatina C nella diagnosi precoce di insufficienza renale in pazienti pediatrici con diabete di tipo 1 afferenti al Centro Diabetologico dell'Ospedale SS. Annunziata di Chieti. Abbiamo definito un protocollo che prevedeva oltre alla raccolta dei dati clinici-anamnestici il dosaggio della Cistatina C, creatinina, glicemia e microalbuminuria. Sono stati esaminati 63 pazienti in età pediatrica (35 maschi e 28 femmine) afferenti al Centro Diabetologico nei primi 6 mesi del 2007. Il dosaggio della Cistatina C e della microalbuminuria sono stati eseguiti con metodica nefelometria su strumento BN II della ditta Dade Behring, mentre il dosaggio della creatinina e la glicemia è stato effettuato su strumento Vitros 950 della ditta Ortho Clinical Diagnostic. L'analisi statistica di Skeweness e Kurtosi per i gruppi presi in esame evidenzia una distribuzione non gaussiana dei dati per alcuni parametri. Il test di Spearman's per la correlazione fra i parametri evidenzia una correlazione negativa della Cistatina C con la clearance della creatinina secondo la formula di Cockcroft e Gault. Questo risultato conferma il ruolo di marcatore precoce dell'insufficienza renale della Cistatina C in un gruppo di pazienti diabetici per i quali assume un grande rilievo prognostico una modesta riduzione del filtrato glomerulare e una diagnosi precoce.

Bibliografia

Pucci L, Triscornia S, Lucchesi D, Fotino C, Pellegrine G, Pardini E, et al. Cystatin C and estimates of renal renal function: searching for a better measure of kidney function in diabetes patients. Clin Chem 2007;53:480-8.

202

INCHIESTA SULLA DIFFUSIONE DEI METODI RIFERIBILI ALLA STANDARDIZZAZIONE IFCC PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ENZIMI DEL SIEROG. Cattozzo¹, M. Borsotti², A. Carobeme³, L.Incorvaia⁴, S. Secchiero⁵, C. Franzini⁶¹AOU Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese²AOU Careggi, Firenze³Laboratorio di Standardizzazione, Diagnostica e Ricerca S. Raffaele, Milano⁴AO Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna⁵Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto⁶Università degli Studi, Milano

La metodo-dipendenza dell'attività catalitica misurabile impedisce l'adozione di valori decisionali condivisi e complica l'interpretazione dei risultati misurati per i pazienti e negli esercizi di VEQ. Sebbene l'applicazione di principi di riferibilità consenta di ottenere risultati accettabilmente sovrapponibili anche utilizzando metodi differenti, l'utilizzazione allargata del medesimo metodo, con caratteristiche corrispondenti al procedimento analitico di riferimento IFCC, consente un più sicuro conseguimento dell'armonizzazione dei risultati. Scopo di questa inchiesta è la verifica della diffusione presso i Laboratori clinici italiani di metodi basati sulla standardizzazione IFCC per la determinazione di ALT, AMY, AST, CK, GGT e LDH. L'inchiesta ha considerato anche i metodi di determinazione dell'ALP, sebbene non sia disponibile un procedimento analitico di riferimento IFCC. Si sono raccolti dati riferibili a più di 1400 Laboratori partecipanti ai 5 programmi di VEQ più diffusi in Italia. Il metodo IFCC per la determinazione della CK è adottato dall'86 % dei Laboratori, con quote comprese tra 82 e 89 % nei diversi programmi di VEQ. Tra gli altri metodi IFCC, quello per l'AMY è adottato dal 44 % (40-48 %) dei Laboratori, quello per la LDH dal 15 % (9-20 %) e quelli per AST ed ALT dal 10 % (0-24 %, per entrambi gli enzimi). Per la GGT non è possibile fare valutazioni valide per l'intero campione, poiché 3 programmi di VEQ cumulano in un unico gruppo metodologico i risultati ottenuti con tutti i metodi che impiegano substrato carbosilato, utilizzati comunque dall'83 % dei Laboratori. Il metodo IFCC è adottato dal 56 % (33-79 %) dei Laboratori aderenti ai due programmi di VEQ che riconoscono un gruppo metodologico IFCC. Il metodo AMP per la determinazione dell'ALP è adottato dal 54 % (48-60 %) dei Laboratori. In conclusione, la maggioranza dei Laboratori clinici italiani non adotta metodi IFCC per la determinazione degli enzimi. Ai fini dell'adozione uniforme dei metodi basati sulla standardizzazione IFCC, le Società Scientifiche possono svolgere un'azione di sensibilizzazione della Professione. L'industria del settore IVD deve rendere disponibili metodi analitici con caratteristiche corrispondenti al procedimento analitico di riferimento IFCC.

203

QUANTITATIVE SERUM FREE LIGHT CHAINS (sFLC) USEFULNESS IN MONITORING DISEASE AND RESPONSE TO COMBINATION TREATMENT IN RELAPSED OR REFRACTORY MULTIPLE MYELOMA

G. Cigliana¹, B. Frollano¹, E. Curti¹, I. Cordone¹, A. Pasquale¹, S. Masi¹, G. Vitelli¹, F. Pisani², M.L. Dessanti², M.C. Petti²

¹SC Patologia Clinica, Regina Elena Cancer Institute, IFO, Rome, Italy

²SC Ematologia, Regina Elena Cancer Institute, IFO, Rome, Italy

Introduction. The introduction of serum free light chains (sFLC) testing in the International Uniform Response Criteria for Multiple Myeloma (1) represents a new way of monitoring both disease and response to treatment in MM patients: the reduction to a 50% of the baseline values of FLC is associated to "near-complete remission" (nCR) and increased FLC values could predict a relapse or a non optimal response to treatment.

Aims. 1) potential feasibility of the combination Bortezomib, liposomal doxorubicin (Myocet®) and dexamethasone (BMD) in the treatment of relapsed/refractory MM patients, 2) evaluation of sFLC and k/λ ratio during and after BMD cycles as prediction of treatment outcome.

Methods. Serial serum samples were collected from 9 patients having completed treatment of four 28-days BMD cycles. (B: 1.3 mg/m² days 1,4,8,11, M: 30mg/m² day 4, D: 20mg days 1-4, 8-11, 15-18). The median age at relapse was 52.5 years (range 48-64). All patients had been already treated (range 1-5 lines). All patients were tested for serum FLC, IFE and BJ protein at baseline and at the end of each cycle and in 4 patients sFLC were evaluated all trough treatment schedule. sFLC were measured by means of a latex enhanced immunoassay (FREELITE®, The Binding Sites, Birmingham, UK) on a Delta nephelometer (Radim, Italy).

Results. After a median follow up of 4 months (range 1-11) 6/6 pts are responders. One pt achieved nCR, 3pts VG-PR (Very Good Partial Remission), 2pts PR (Partial Remission). In all 6 pts the proportion of bone marrow aberrant plasma cells, as per flow cytometry, decreased after 4 treatment cycles. In all patients the absolute values of sFLC and their ratio were correlated with disease, response to treatment and during follow-up we'll evaluate an anticipated relapse. **Conclusions:** In our experience BMD regimen has shown a feasibility in pts previously heavily treated. BMD provided an optimal disease burden leading almost all patients to HDT and transplant in ideal condition. Furthermore, although an adequate follow up is needed to drawn any conclusions, sFLC testing seems to provide a more sensitive mean of monitoring response and identify residual disease and can be used in assessing stringent complete response.

Reference

1. Durie BGM, Leukemia 2006;20:1467-73.

204

URINARY NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN (NGAL): UN MARCATORE UTILE IN CORSO DI TRAPIANTO RENALE?

C. Cocco¹, S. Dal Dosso¹, A. Sorio¹, S. Meneghelli¹, B. Caruso¹, F. Fior², L. Boschiero², P. Rizzotti¹

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

²Chirurgia Gen. Clin. I (Area Trapianti di Rene), OCM, Azienda Osp. di Verona

Scopo del lavoro. L'NGAL è una proteina presente non solo nei neutrofili ma anche nelle cellule epiteliali del tubulo renale. Risulta essere un marcatore emergente nell'ambito della valutazione del danno renale acuto e dei conseguenti processi riparativi. Si è voluto studiare l'andamento delle concentrazioni urinarie di NGAL durante le prime ore dal trapianto renale.

Materiali e Metodi. I pazienti selezionati sono stati 5 Riceventi d'organo e 4 Donatori e sono stati raccolti 25 campioni di urine estemporanee in corso di trapianto renale ad intervalli di 6, 12, 24 ore. L'NGAL è stata determinata con un kit del commercio: NGAL ELISA (AntibodyShop). Per la calibrazione sono stati utilizzati 8 calibratori a concentrazione crescente di NGAL fino a 1000 ng/L. Le determinazioni sui campioni sono state eseguite in triplo utilizzando diluizioni 1:500, 1:250, 1:100 allo scopo di evidenziare la diluizione ottimale. Negli stessi campioni è stata dosata la creatinina (crea) con Dimension® RxL (Siemens).

Risultati. La diluizione ottimale è risultata essere quella 1:500 in quanto ha reso possibile tutte le misurazioni. I 4 Donatori hanno presentato valori di NGAL compresi fra 46 – 768 µg/g crea, decisamente inferiori rispetto ai valori rilevati nei 5 pazienti Riceventi in cui l'intervallo era compreso fra 239 – 14079 µg/g crea. Nei 5 Riceventi si è osservata una marcata diminuzione dei valori di NGAL (µg/g crea) a 12 e 24 ore rispetto a quanto rilevato nelle prime 6 ore post-trapianto: Paz. RO = 14079 (6h), 6895 (12h), 3389 (24h). Paz. AA= 4061 (6h), 459 (12h), 1077 (24h). Paz. BB = 9869 (6h), 5743 (12h), 2547 (24h). Paz. CL = 4596 (6h), 2190 (12h), 239 (24h). Paz. SA = 8547 (6h), 1828 (12h), 1389 (24h). Nei 5 casi presi in esame si è evidenziata una normalizzazione della creatinina sierica entro i primi 3 giorni dal trapianto: parametro attualmente considerato di riferimento nella valutazione post-operatoria del trapianto renale.

Discussione e Conclusioni. I dati preliminari da noi ottenuti mostrano una diminuzione di NGAL/creatinina urinaria in corso di trapianto che potrebbe rivelarsi un indice di buon funzionamento renale più precoce dei dosaggi di creatinina sierica valutati durante i tre giorni successivi al trapianto.

Bibliografia

1. Ann Intern Med 2008;148:810-9.

205

PRESENZA DI BANDA ANOMALA BETA1/BETA2 SU ELETTROFORESI CAPILLARE: INTERFERENZA DA IOMEPROLO

T. De Michele¹, D. Scribano¹, S. Di Leva¹, B. Fusco², C.A. Callà¹, B. Giardina¹, C. Zuppi¹

¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Dip. di Medicina Cardiovascolare, U.O. per il Dolore Toracico, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Introduzione. Lo iomeprolo è un agente di contrasto, triadato, non ionico, idrosolubile, a bassa osmolarità usato in molte indagini radiologiche.

È noto in letteratura che l'elettroforesi capillare può risentire di possibili interferenze da parte di sostanze esogene non proteiche, come da agenti radio opachi o antibiotici, che possono simulare la comparsa di una componente monoclonale (1). Infatti l'elettroforesi capillare evidenzia le proteine con la lettura in UV a 200nm, lunghezza d'onda che corrisponde non solo all'assorbimento del legame peptidico ma anche ai precipitati da mezzi di contrasto.

Poiché abbiamo notato reperti sempre più frequenti in elettroforesi proteica capillare di bande anomale in regione beta-1/beta-2 globuline nei traccati di pazienti sottoposti a coronarografia con iomeprolo, abbiamo voluto valutare nel tempo la pseudoparaproteinemia per fornire ai clinici più sicure indicazioni.

Pazienti e metodi. Sono stati studiati 50 pazienti (38 maschi e 12 femmine con età media di 65 anni), provenienti dal reparto di Unità Coronarica del nostro Policlinico e sottoposti a coronarografia con somministrazione di Iomeron 350 (vita media 109').

Sono stati eseguiti 4 prelievi per elettroforesi proteica capillare (Cappillarys Sebia), al tempo 0,6,12 e 24 ore dopo la somministrazione di Iomeron per coronarografia. Per ciascun soggetto è stata valutata la funzionalità renale, la quantità di Iomeron infuso e la durata della somministrazione.

Risultati. I traccati dei pazienti hanno evidenziato la presenza di bande anomale in regione beta-1 e beta-2 globuline nel prelievo a 6 ore nel 100% dei casi, nel 30% nel prelievo a 12 ore, e assenza della banda nel 100% dei casi nel prelievo a 24 ore.

La quantificazione di tali bande, comprese tra il 2 e il 5% delle proteine totali, evidenzia una correlazione significativa con la funzionalità renale del paziente, con la quantità e la durata dell'infusione dell'Iomeron 350.

Conclusioni. I risultati ottenuti suggeriscono la necessità di eseguire i prelievi per elettroforesi capillare dopo almeno un giorno dalla somministrazione di sostanze radio opache, evitando ulteriori indagini immunologiche per sospetto di patologia monoclonale.

Bibliografia

1. Bossuyt X. Interferences in clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins. *Electrophoresis* 2004;25:1485-7.

206

S-NITROSOGLUTATHIONE AS A SUBSTRATE OF GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE (GGT) – A KINETIC STUDY

I. Fornaciari¹, V. Angeli², M. Franzini¹, V. Fierabracci³, A. Paolicchi³, A. Pompella³, A. Clerico¹, E. Bramanti²

¹Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²Istituto per i Processi Chimico-Fisici, CNR, Pisa

³Dip. Patologia Sperimentale B.M.I.E., Università di Pisa, Pisa

S-Nitrosoglutathione (GSNO) is a nitric oxide (NO) donor compound which has been postulated to be involved in transport of NO in vivo. gamma-Glutamyltransferase (GGT) is one of the enzymes involved in the enzyme-mediated decomposition of GSNO [1], but the kinetics of the enzymatic reaction GSNO/GGT has not been studied so far.

We investigated the kinetics of GGT with respect to GSNO as a substrate and glycylglycine (GG) as acceptor co-substrate by spectrophotometry at 334 nm. GGT hydrolyses the gamma-glutamyl moiety of GSNO to give S-nitrosocysteinylglycine (CGNO) and gamma-glutamyl-GG. However, as both the substrate GSNO and the first product CGNO absorb at 334 nm, we optimized an ancillary reaction coupled to the enzymatic reaction, based on the copper-mediated decomposition of CGNO yielding oxidized cysteinylglycine and NO. The ancillary reaction allowed us to study directly the GSNO/GGT kinetics by following the decrease of the characteristic absorbance of nitrosothiols at 334 nm. A Km of GGT for GSNO of 0.398 ± 31 mmol/L was thus found, comparable with the Km value for GSH (0.4 mmol/L).

Serum GGT is a biomarker of future occurrence of diabetes and cardiovascular events, and GGT values within the reference range are positively associated with the risk of onset and evolution of atherosclerosis and related diseases, such as hypertension, type II diabetes, and metabolic syndrome. Since GGT converts GSNO - a stable transport/storage species of NO - into CGNO, that can release NO in the presence of trace amounts of Cu(II), in plasma containing high levels of GGT the non-specific release of NO from GSNO/GCNO can decrease the amount of NO being transported for its endocrine role in target compartments. It cannot be excluded that the role of GGT in GSNO metabolism may concur to the described association of GGT with important diseases: a hypothesis certainly deserving further investigation.

Reference

1. Al-Sa'doni H, Ferro A. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clin Sci (Lond)* 2000;98(5):507-20.

207

CONFRONTO FRA DUE METODI HPLC NELLA RILEVAZIONE DELL'HbA1c IN CAMPIONI CON E SENZA VARIANTI EMOGLOBINICHE

C. Freddi¹, P.A. Amboni¹, C. Nani¹, C. Maestroni¹, I. Calufetti¹, R. De Marinis², C. Ottomano¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Dipartimento di Medicina di Laboratorio A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo

²Tosoh Bioscience S.r.l.

Introduzione. Tra i sistemi diagnostici attualmente utilizzati per la determinazione dell'Emoglobina Glicata, per il monitoraggio a medio-lungo termine del Paziente diabetico, l'HPLC rappresenta quello d'elezione per la sua maggior sensibilità, accuratezza analitica, standardizzazione dei metodi analitici e dei materiali di riferimento.

Alcune varianti emoglobiniche, tuttavia, possono comportare discrepanze di risultati tra i metodi HPLC valutati, per interferenze di segno positivo o negativo: l'attento esame del cromatogramma, allorché evidenzia la presenza di picchi anomali, può consentire ugualmente una corretta interpretazione dei risultati ottenuti.

Scopo. Valutare gli effetti della presenza di varianti emoglobiniche nella determinazione dell'HbA1c, utilizzando due metodi diversi.

Materiali e metodi. I campioni di 287 Pazienti afferiti al nostro Laboratorio per la ricerca dell'Hb Glicata e/o Patologica, sono stati sottoposti all'esame col metodo in uso (Menarini Adams A1c HA-8160) e con quello candidato (Tosoh HLC-723G7HbA1cVariant Mode), seguendo le raccomandazioni dei Produttori. Le varianti emoglobiniche sono state identificate con Tosoh HLC-723G7BetaThal Mode. I campioni sono stati conservati a 2°-8° C se analizzati entro 7 giorni dalla corsa in HPLC, congelati e scongelati se analizzati oltre tale limite di tempo.

Risultati. I due sistemi, su campioni normali (269), presentano una buona correlazione ($R^2=0.9843$).

Le varianti omozigotiche (HbS, HbC), hanno talora mostrato, per entrambi i metodi, inesattezza analitica (assenza o verosimile sottostima).

Per le eterozigosi (HbS, HbC), i risultati ottenuti con i due metodi, appaiono sovrapponibili (ulteriori conclusioni necessitano di una maggiore numerosità del campione).

In presenza di HbD eterozigote è evidente una sensibile sottostima (o la mancata rilevazione) dell'Hb Glicata, da parte del sistema HA-8160, ma non del sistema HLC-723G7.

Conclusioni. L'interferenza delle varianti emoglobiniche dovrebbe influenzare la scelta del metodo HPLC per la determinazione dell'HbA1c soprattutto se, nella sua popolazione afferente, è elevata la prevalenza di emoglobinopatie.

Bibliografia

Mongia SK et al. Effects of Hemoglobin C and S Traits on Fourteen Commercial Glycated Hemoglobin Assays Amer J Clin Path 2008;130:136-40.

208

E' POSSIBILE UTILIZZARE UN CAMPIONE DI URINE FRESCHE PER LA MISURA DELLA PROTEINA DI BENICE JONES? RISULTATI PRELIMINARI

M.S. Graziani¹, V. Meneghini², M.G. Anselmi¹, M. Marini¹, R. Patuzzo¹, G. Righetti¹, L. Zanardi¹, P. Rizzotti¹, G. Gambaro³

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

²Unità Operativa di Ematologia, Università di Verona, Italy

³Divisione di Nefrologia, Università di Verona, Italy

Introduzione. La gestione del paziente con componente monoclonale (CM) prevede, fra i parametri di laboratorio, la misura della proteina di Bence Jones (PBJ) nelle urine di 24 ore. È noto che tale campione è spesso poco accurato e di non facile gestione per il paziente. Scopo del lavoro è verificare se l'informazione clinica ricavata dal campione di 24 ore è ottenibile anche in un campione più semplice quale quello fresco.

Materiali e Metodi. Urine fresche e di 24 ore sono state ottenute da pazienti (n=12) con CM partecipanti ad uno studio sull'utilizzo della misura delle catene leggere libere sieriche. Sui campioni sono state misurate proteine totali e creatinina ed è stata eseguita una elettroforesi urinaria con scansione del picco PBJ eventualmente presente. La concentrazione di PBJ è stata calcolata come % del picco su proteine totali ed espressa come mg/24 o mg/mmol di creatinina.

Risultati. In 2 pazienti PBJ era assente in entrambi i campioni, in 1 paziente era evidente solo nel campione fresco. Nei restanti 9, la PBJ espressa in mg/mmol di creatinina era simile nei due tipi di campione (differenza media 11 ± 78). Due campioni presentavano una differenza importante (~100 mg/mmol), la concentrazione più elevata era riscontrata in un caso nel campione fresco e nell'altro nel campione 24 ore. La concentrazione espressa in mg/24h era maggiore di un fattore di circa 10 rispetto al campione fresco (mg/mmol); un paziente in dialisi (diuresi 100 mL) presentava una concentrazione molto più elevata nel campione fresco (700 vs 67).

Discussione. Le raccomandazioni attuali prevedono che nella gestione del paziente con CM si utilizzi la concentrazione di PBJ nelle 24 ore. La possibilità di impiegare un campione fresco potrebbe semplificare questa operatività. L'esiguità della casistica attuale non consente di ricavare dati sicuri, tuttavia qualche considerazione è possibile. In nessuno dei 12 pazienti PBJ era assente nel solo campione fresco, mentre in un caso è stato vero il contrario. La concentrazione espressa in mg/mmol di creatinina evidenzia minime differenze tra i due tipi di campione. La diuresi elevata che viene mantenuta in questi pazienti per ragioni terapeutiche, spiega probabilmente la maggiore quantità di PBJ che si riscontra nel campione di 24 ore.

209

LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER LA MISURA DELLA ALBUMINA NELLE URINE: STUDIO DI ALCUNE VARIABILI

M.S. Graziani¹, M.G. Anselmi¹, M. Marini¹, R. Patuzzo¹, G. Righetti¹, A. Strazzer¹, P. Rizzotti¹

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

Introduzione. La standardizzazione della misura della albumina nelle urine è un problema importante. Tra le variabili preanalitiche, la preparazione del campione è uno dei problemi da affrontare data la relativa instabilità della proteina nel contenitore di raccolta (legame alle pareti di plastica, inclusione nei cristalli del campione e così via). Scopo di questo lavoro è di valutare se diverse modalità di pretrattamento del campione (temperatura di conservazione, centrifugazione) possono influenzare la misura della proteina.

Metodi. 95 campioni di urine fresche consecutivi ricevuti con richiesta di albumina, sono stati trattati, prima della misura, con tre diverse modalità: 1. conservazione a temperatura ambiente per tre ore; 2. come al punto 1 e successiva centrifugazione (10 minuti, 1500 g, +4°C); 3. conservazione a +4°C per tre ore e centrifugazione. La misura è stata eseguita su Immage 800 (Beckman Coulter) ed espressa in mg/L e in rapporto a creatinina (ACR) in mg/mmol.

Risultati. Le differenze medie tra le diverse modalità sono modeste: -0.46 ± 0.34 (2vs1) e -0.95 ± 3.27 (3vs1) (mg/L). L'ACR calcolato utilizzando i valori misurati dopo i tre diversi pretrattamenti è risultato per tutti i campioni concorde rispetto al valore decisionale proposto (superiore o inferiore a 3.4 mg/mmol) indipendentemente dalle modalità di trattamento del campione.

Discussione. A fronte della rilevante importanza clinica della albuminuria, la standardizzazione della sua misura è ancora carente. Tra le variabili preanalitiche, è stato suggerito che i diversi pretrattamenti del campione possano influenzare la misura. I risultati di questo lavoro depongono per una minima interferenza dei diversi pretrattamenti del campione sulla concentrazione di albumina. Anche se il trattamento (refrigerazione, centrifugazione) provoca mediamente una modesta diminuzione della concentrazione di albumina, le differenze riscontrate non spostano il valore di ACR rispetto al valore decisionale. È possibile ipotizzare quindi che, nei campioni esaminati, l'albumina non si è legata alle pareti del contenitore né è stata inglobata nei cristalli precipitati a freddo in quantità tale da inficiare l'utilizzo clinico del dato.

210

PROTEOMIC ANALYSIS OF HAPTOGLOBIN CHAINS IN SYSTEMIC SCLEROSIS PATIENTS

R. Guerranti², E. Bertocci², C. Muzzi², N. Hope-Onyekwere², A. Cortelazzo², N. Giordano², P. Papakostas², A. Montella², C. Scapellato¹, R. Pagani²

¹Laboratorio Analisi Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese

²Dept. Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica

Aim. Haptoglobin (Hpt), consisting of α and β chains, is strictly associated with systemic inflammatory diseases [1]. Hpt α and β chains form three phenotypes: Hpt 1-1 (only α 1), Hpt 2-1 (α 1 and α 2) and Hpt 2-2 (only α 2). Each chain presents different subunits. In this work, a proteomic approach was used to analyze the Hpt chain subunits in serum of Systemic Sclerosis (SSc) patients with respect to control.

Methods. Sera of 9 controls and 23 patients were analyzed. After depletion of the most abundant serum proteins, samples were separated by 2D-E using a 3-10 NL pH gradient followed by a 15% SDS-PAGE.

Results. analysis of α and β chains was used for Hpt phenotyping. Among the control group were 3 Hpt 2-2, 4 Hpt 2-1 and 2 Hpt 1-1; in patient group, 10 Hpt 2-2, 13 Hpt 2-1 and 0 Hpt 1-1. 2D-E of serum shows that α 2 chain consists of three spots (a, b, c) and α 1 chain of two spots (d, e). Analyzing the frequency of α 2, we demonstrated that both spots a and b are present in all the control and patient sera, spot c is present in 55.5% of controls and in 91.3% of patients. Analysis of α 1 chain shows that spots d is present in 55.5% of control and 39.1% of SSc sera respectively; spot e appears in 22.2% of controls and in 26.1% of patients. Considering α 2 and α 1 spots volume, we showed that a, b and c present about the same volume in control and SSc samples, d and e ($p < 0.05$) are lower in patients than in controls. The β chain analysis demonstrates a significant difference of some of these subunits in the SSc samples with respect to controls.

Conclusions. Previously we showed a statistically significant association of SSc with the Hpt phenotype with the frequency of Hpt 2-2 higher in SSc patients (64.3%) as opposed to that of controls with only 33.3%. The proteomic analysis of α 2 chain shows a different frequency of spot c of patients respect to the same spot in control. Then analysing the volume of each spot we demonstrated a lower expression of spot d and e in SSc patient. This study showed also some modification of patient Hpt β chains with respect to the control. Since only α chains determine the Hpt phenotype, the modification of β chains subunits was not demonstrated in this work.

Reference

1. Pavon EJ et al. Proteomics 2006;6:S282-92.

211

COMPARISON OF CAPILLARY AND AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS FOR THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL IMMUNOGLOBULINS

L. Infusino¹, A. Dolci¹, M. Panteghini¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Ospedale "Luigi Sacco" e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Cliniche, Università degli Studi, Milano

The aim of this study was to compare the performance of two systems for agarose gel (AGE) and capillary (CZE) serum protein electrophoresis (SAS3/4/5 Alfa Wassermann and Paragon CZE 2000 Beckman Coulter) for the detection and characterization of monoclonal immunoglobulins (M proteins). Two independent persons reviewed 960 consecutively ordered serum protein electrophoresis patterns, 79 (8.2%) of which showed one or more M proteins at immunofixation. For M protein detection, we found similar sensitivities for AGE and CZE (89.9% vs. 94.9%, $P = 0.368$), with AGE showing high specificity than CZE (99.3% vs. 96.3%, $P < 0.0001$). With regards to M protein characterization, performed on a series of 41 consecutive samples (25 of which positive for M proteins), agreement between methods was 97.6%. A good correlation ($r^2 = 0.947$) was found when the two methods were compared for M protein quantitation ($n = 180$), even if a more pronounced bias was noted with M protein concentrations > 25 g/L. In agreement with a recently published study (1), we conclude that both AGE and CZE techniques can be used in clinical laboratories for M protein detection and characterization, even if the detection specificity of AGE as a screening test is higher.

Reference

1. McCudden CR, Mathews SP, Hainsworth SA, et al. Performance comparison of capillary and agarose gel electrophoresis for the identification and characterization of monoclonal immunoglobulins. *Am J Clin Pathol* 2008;129:451-8.

212

MISURA SU DIMENSION RXL DELLA APTOGLOBINA: CONFRONTO CON UN METODO NEFELOMETRICO

C. Lo Cascio¹, G. Righetti¹, M. Bertolani¹, A. Strazzer¹, P. Rizzotti¹

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

Introduzione. La misura della aptoglobina viene indicata come un parametro utile per la diagnosi di emolisi intravascolare. In questo ambito la sua misura su un analizzatore di chimica clinica utilizzabile in regime di urgenza, può risultare di interesse. Scopo del lavoro è il confronto fra un metodo nefelometrico, classicamente utilizzato per la misura delle proteine, ma di problematico uso in urgenza, con un immunodosaggio turbidimetrico

Materiali e Metodi. 62 campioni di siero random, di cui 37 da pazienti sottoposti ad intervento in circolazione extracorporea; 15 campioni in cui è stata indotta emolisi in vitro Reagente Sentinel applicato su Dimension RxL (Siemens), reattivo Beckman-Coulter, applicato su nefelometro Immage 800 (Beckman-Coulter), entrambi standardizzati CRM470.

Risultati. I CV su Dimension sono 2.1% e 2.91% alla concentrazione rispettivamente di 0.67 g/L e 1.71g/L; le prestazioni di Immage sono: CV 1.7%, (0.58g/L) e 2.1% (1.9 g/L).

La correlazione Dimension-Immage nell'ambito 0-3.7 g/L, esaminando tutti i campioni, è: $y = 0.86x + 0.134$ ($r^2 = 0.96$), con una deviazione dalla linearità nella parte bassa della curva, in cui Dimension mostra un bias positivo. Eliminando i campioni con emolisi visibile si ottiene la seguente correlazione: $y = 0.78x + 0.32$ ($r^2 = 0.95$) e non si evidenziano comportamenti difformi. Dall'analisi dei campioni con emolisi indotta, si evidenzia un bias mediano dopo emolisi di 1% per Dimension e di -11% per Immage.

Discussione. La precisione del metodo in esame risulta soddisfacente, come pure la correlazione tra i due metodi. La correlazione non buona nella parte bassa della curva sembra dovuta al fatto che i campioni presi in esame erano campioni emolizzati provenienti da pazienti in circolazione extracorporea. In presenza di emolisi, come si evince dall'analisi dei dati ottenuti inducendo l'emolisi in vitro, i due metodi sembrano comportarsi in maniera diversa, riflettendo probabilmente la differenza di anticorpi utilizzati (diverso riconoscimento dell'aptoglobina complessata con l'emoglobina?). L'emolisi in vitro sembra infatti paradossalmente aumentare la concentrazione dell'aptoglobina su Dimension mentre diminuisce quella su Immage. Resta da valutare se anche l'emolisi in vivo possa interferire allo stesso modo.

213

ACTIVITIES OF ERYTHROCYTE ANTIOXIDANT ENZYMES IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS PATIENTSM.R. Metelli¹, P. Bongioanni², F. Manzone¹, C.Domenichini¹, F. Fulceri¹, B. Rossi², P. Pietrini¹¹U.O. Lab. Analisi Chimico Cliniche Specializzate Universitaria, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Università di Pisa²U.O. Neuroriabilitazione Universitaria, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Università di Pisa

Objectives. Antioxidant defense enzymes are involved in many pathogenetic events, including motor neuron degeneration: erythrocyte glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD)-1 and total antioxidant status (TAOS) are able to detoxify reactive oxygen species (ROS) endogenously or exogenously produced. In the present study, we assayed GP, GR, SOD-1 activities and TAOS levels in patients affected by amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and age- and sex-matched healthy controls.

Subjects and methods. 49 ALS patients (19 women and 30 men) and 41 healthy control subjects (21 women and 20 men) were studied. ALS patients were subdivided into clinically probable (n = 20) and definite (n = 29) ones (Escorial criteria). 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: scores between 10 and 0). Erythrocyte GP, GR and SOD-1 activities and TAOS plasma levels were assayed by Randox kits.

Results. GP activity and TAOS levels were found to be significantly ($p < 0.001$ and $p > 0.00001$, respectively) reduced in ALS patients compared to healthy subjects (32.2 ± 9.7 vs 43.4 ± 11.7 U/g and 0.70 ± 0.16 vs 0.87 ± 0.14 mmol/l, respectively), whereas GR and SOD-1 activities were statistically similar in ALS patients and healthy controls. No significant differences in activities of antioxidant enzymes and TAOS levels were observed among ALS patients' classes.

Discussion. As previously observed by other authors, we found SOD-1 activity unchanged in ALS patients compared to controls. Reduced GP activity suggests that a possible imbalance of antioxidant defenses and ROS may occur intracellularly: increased amounts of free ROS would cause damage to some relevant biomolecules, such as cell membrane lipids and proteins, thus activating apoptosis. Our findings of significantly reduced TAOS levels in ALS patients compared to healthy controls further support the classical concept of systemically decreased antioxidant defence mechanisms in ALS patients. Although one can not establish if oxidative stress is a cause or a consequence of neurodegeneration in ALS patients, our data clearly demonstrate that oxidative stress is involved in ALS.

214

IL DOSAGGIO DELLA CISTATINA C PER LA VALUTAZIONE DELLA VELOCITA' DI FILTRAZIONE GLOMERULAREV. Rizza¹, F. Lavarda¹, G. Olivieri¹, C. Bazzi²¹Lab. di Analisi Chimico Cliniche e di Ematologia, Osp. San Carlo Borromeo, Milano²Fondazione D'Amico per la Ricerca sulle Malattie Renali, Milano

Introduzione. Nella pratica clinica per la diagnostica delle nefropatie si è sempre utilizzata la creatinina. Con il suo dosaggio viene eseguito il calcolo della clearance della creatinina e il calcolo dell' eGFR (estimated Glomerular Filtration Rate) utilizzando per lo più la formula MDRD (Modification of Diet in Renal Disease). Da qualche anno per la valutazione della funzione renale è stata proposta la Cistatina C.

Scopo e Metodi. Verificare la comparabilità della stima del GFR utilizzando la clearance della creatinina, la formula MDRD e alcune formule proposte da vari autori che utilizzano la Cistatina C. I campioni utilizzati sono stati 45.

Risultati. Le rette di regressione ottenute sono le seguenti: Clearance della Creatinina = $-4 + 1,4 \times \text{MDRD}$, $R^2=0,5$; Arnal = $-2 + 1,03 \times \text{MDRD}$, $R^2=0,84$; Filler = $4 + 1,19 \times \text{MDRD}$, $R^2=0,85$;

Grubb = $-10 + 1,25 \times \text{MDRD}$, $R^2=0,81$; Hoek = $4 + 0,99 \times \text{MDRD}$, $R^2=0,85$; Larsson = $0 + 1,04 \times \text{MDRD}$, $R^2=0,85$. Ponendo come metodo di riferimento per la stima del GFR la formula MDRD e usando un cut-off di 60 mL/min per definire lo stato di malattia i risultati ottenuti sono i seguenti: Clearance della creatinina, sensibilità 69% specificità 80%; Arnal, sensibilità 94% specificità 90%; Filler, sensibilità 71% specificità 100%; Grubb, sensibilità 89% e specificità 90%; Hoek, sensibilità 89% specificità 90%; Larsson, sensibilità 89% specificità 90%.

Conclusioni. Rimane sempre problematica la stima del GFR utilizzando la clearance della creatinina per i noti problemi di raccolta delle urine delle 24 ore. Le varie formule che usano la Cistatina C sono ben correlate con la MDRD. Utilizzando il cut-off di 60 mL/min per definire lo stato di malattia i risultati migliori si sono ottenuti con la formula di Arnal. L'analisi delle discordanze nella classificazione di malattia ha evidenziato che uno stesso paziente veniva diversamente classificato con MDRD o Cistatina C. Riteniamo che, essendo più facile controllare il dato di plausibilità della creatinina quest'ultima sia da preferire alla Cistatina C per la stima del GFR.

Bibliografia

Beauvieux MC et al. New predictive equations improve monitoring of kidney function in patients with diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:1988-94.

215

IMMUNOAFFINITY PURIFICATION AND MASS SPECTROMETRY CHARACTERIZATION OF SERUM AMYLOIDOGENIC FREE LIGHT CHAINS IN AL AMYLOIDOSIS

F. Lavatelli¹, V. Valentini¹, T. Bosoni², G. Sarais¹, R. Albertini², R. Moratti², B. Amoroso³, G. Merlini¹

¹Center for Amyloidosis – Biotechnology Research Lab. and Dept. of Biochemistry, Fondazione I.R.C.C.S. San Matteo, Pavia

²Clinical Chemistry Laboratory, “Fondazione I.R.C.C.S. San Matteo”, University of Pavia

³The Binding Site

Introduction. Circulating monoclonal free immunoglobulin light chains (FLCs) play a central pathogenetic role in light chain amyloidosis (AL) and other FLC deposition diseases. Detailed biochemical characterization of serum FLCs may help find features related to their deposition and toxicity. We developed an immunoprecipitation (IP)-based approach for isolating FLCs from patients serum, suitable for subsequent analyses such as mass spectrometry (MS).

Methods. The presence of monoclonal FLCs in serum of patients with AL amyloidosis was assessed by immunofixation and by the κ/λ ratio derived from the FLC concentration measured by particle-enhanced nephelometry (FreeliteTM, The Binding Site) on a Behring BN II (Dade Behring) nephelometer. Antibodies against κ and λ FLC (The Binding Site) were covalently immobilized onto surface-activated agarose beads (Pierce Aminolink PlusTM) and used for IP of 50-200 μ L of serum. Free light chains were eluted and analyzed by SDS-PAGE, immunoblotting and MALDI-TOF MS on a Micromass MicroMXTM instrument. In case of available bone marrow, the amino acid sequence of the monoclonal amyloidogenic FLCs was deduced from their coding mRNA in plasma cells.

Results. Nine AL patients were studied (6 λ , 3 κ), all of whom had elevated serum λ (range 250-580 mg/L, reference interval 5,71 - 26,30 mg/L) or κ (range 420-930 mg/L, r. i. 3,30 - 19,40 mg/L) FLCs, respectively, abnormal κ/λ ratio and positive immunofixation. After IP and SDS-PAGE, the FLCs bands (whose nature as λ or κ FLCs was confirmed in each case by immunoblotting) were the predominant species, with minimal contamination by albumin and immunoglobulin heavy chains. Lambda FLC were visible as single bands, while multiple species of κ FLC were found in all AL κ patients, suggesting proteolytic processing. In 2 AL λ cases, the captured FLC were analyzed by MS; the peaks in the spectra assignable to the light chain sequenced from bone marrow were the most intense, indicating high homogeneity of the captured FLCs, and thus clonality.

Conclusions. This approach efficiently isolates circulating FLCs, preserving their chemical integrity and with minimal contamination by other serum proteins and allows to detect post-translational modifications relevant for amyloid deposition.

216

OXIDATIVE METABOLISM OF DOPAMINE: A COLOUR REACTION FROM HUMAN MIDBRAIN ANALYSED BY MASS SPECTROMETRY

A. De Iuliis¹, G. Arrigoni², L. Andersson², A.P. Burlina³, P. Zambenedetti⁴, P. James², F. Vianello⁵, P. Arslan¹

¹Dip. di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali, Università di Padova, Italy

²Dept. of Protein Technology, University of Lund, Sweden

³Unità di Neurologia, Osp. San Bassiano, Bassano, Italy

⁴Div. di Anatomia Patologica, Osp. di Dolo-Venezia, Italy

⁵Dip. di Chimica Biologica, Università di Padova, Italy

In order to identify the protein responsible for a dopamine peroxidizing activity, first by us described in human normal and parkinsonian substantia nigra (1, 2), we have developed non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis conditions, mimicking the characteristic colour in vitro reaction, resulting from cyclic oxidation of dopamine (DA). After separating protein mixtures from human normal midbrain homogenates on two sets of identical native gels, one gel set was subjected to specific activity staining by using DA and hydrogen peroxide and the second set of gels was stained with Coomassie Blue. The reactive gel bands were analysed by mass spectrometry. As blank sample, a colourless band was cut, immediately below the reactive band.

An activity red/orange band appeared in midbrain tissue lanes of the gel set treated with the substrate, similarly to the lane where commercial horseradish peroxidase (HRP) was present as control of peroxidative activity. The Coomassie Blue stained gel set showed other, not enzymatically active, protein bands.

Mass spectrometry analysis of the enzymatically active bands of the gel led to the identification of a series of proteins that may play a role in neurodegenerative disease, highlighting a possible functional link among dopamine/dopaminochrome redox cycle and protein metabolism. References

- Galzigna L, De Iuliis A, Zanatta L. Enzymatic dopamine peroxidation in substantia nigra of human brain, Clin. Chim. Acta 2000;300:131-8.
- De Iuliis A, Burlina AP, Boschetto R, Zambenedetti P, Arslan P, Galzigna L. Increased dopamine peroxidation in post-mortem Parkinsonian brain. Biochim Biophys Acta 2002;1573:63-7.

217

ETEROGENEITA' DI COMPONENTI MONOCLONALI IgG IN IMMUNO-ISOELETTROFOCALIZZAZIONEG. Previtali¹, M. Amadei¹, G. Bergamaschi¹, M. Donati¹, M. Frasanni¹¹Dip. Patologia Clinica, P.O. di Fidenza, AUSL di Parma

Abstract. In questo lavoro è stato valutato il comportamento di piccole componenti monoclonali (< 5 g/L) di classe IgG in immuno-IEF e la loro corrispondenza al modello "ladder" indice della microeterogeneità della molecola.

La definizione che a una banda monoclonale corrisponde un unico clone cellulare è valido per l'EF, ma non per l'IEF(1). L'elettroforesi serica (EF), l'immunofissazione (IF) e l'isoelettrofocalizzazione (IEF) sono state eseguite in gel di agarosio su strumento Hydrasys della SEBIA secondo le indicazioni fornite dalla Ditta.

Le componenti monoclonali (CM) analizzate in IEF evidenziano una eterogeneità non sempre riferibile al modello "ladder" presentando alcune, in prevalenza di classe IgG-lambda, un profilo decisamente "oligoclonale".

Modificazioni post-secrezionali sembrano non giustificare questa spiccata eterogeneità dovuta probabilmente a processi infettivi, infiammatori o autoimmuni che si sommano alla presenza della CM.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati in IEF 34 campioni di siero che presentavano all'EF e all'IF le seguenti caratteristiche:

19 piccole CM di classe IgG (<5 g/L) 10 IgG-K e 9 IgG-L, 1 biconale di classe IgG, 2 IgA-k, 2 IgM-k, 2 sospette CM risultate negative all'IF, 8 Ig policlonali.

La strumentazione utilizzata è stata l'Hydrasys Focusing, strumento semiautomatico della SEBIA utilizzando il kit "Hydrigel 3-CSF" in accordo con le indicazioni fornite dalla Ditta.

Risultati e Discussione. I 34 campioni di siero provengono da pazienti esterni di cui 19 con piccole MGUS. Gli otto campioni con Ig policlonali e valori elettroforetici nella norma sono stati scelti "random" fra i sieri di una giornata lavorativa ed hanno evidenziato la presenza di un profilo "oligoclonale" nel 37% dei casi (3/8 campioni) simile alla percentuale di presenza nei pazienti con piccola CM 31% (6/19 campioni). Un profilo oligoclonale nel siero è un rilievo relativamente frequente infatti si manifesta in tutta una serie di patologie, più o meno gravi, quali malattie infiammatorie sistemiche, infezioni, malattie autoimmuni. Dei 6 campioni con CM e profilo oligoclonale 5 sono di classe IgG-lambda.

Bibliografia

1. Franciotta D et al. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology* 2004.

218

RISULTATI DEL QUESTIONARIO DIFFUSO DURANTE IL XVI CORSO CEFAR "LE PROTEINE: DAL LABORATORIO ALLA CLINICA" (per il Gruppo di Studio Proteine)A. Caldini¹, M.S. Graziani², A. Terreni¹, G. Merlini³¹Laboratorio Generale, Dipartimento Diagnostica di laboratorio, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze²Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera di Verona³Tecnologie Biomediche e Biotecnologie, Ospedale Policlinico San Matteo, Pavia

Introduzione. L'elettroforesi sieroproteica (SPE) ha come finalità principale la ricerca delle componenti monoclonali sieriche (CM). La fase post analitica, che include l'interpretazione e la refertazione, è poco standardizzata e merita attenzione. Con lo scopo di valutare il grado di omogeneità di refertazione tra i laboratori italiani il GdS Proteine ha avviato una indagine conoscitiva.

Materiali e metodi. È stato preparato un questionario contenente 9 domande che è stato distribuito, durante il XVI Corso "Le proteine: dal Laboratorio alla Clinica". Sono stati raccolti 89 questionari corrispondenti a circa il 5% dei laboratori ospedalieri italiani.

Risultati. Il tracciato elettroforetico viene inviato ai clinici dal 72% dei laboratori, il 9% lo invia solo in presenza di CM, mentre un 8% lo invia anche in caso di altri tipi di anomalia. Il 64% dei laboratori non inserisce un commento che attesti la mancanza di anomalie riferibili a CM, mentre nel 65% dei casi vengono inseriti commenti riguardanti altri tipi di anomalie. Le anomalie riferibili a CM vengono definite come "componenti monoclonali" dall'80% dei laboratori, mentre nel restante 20% si ricorre ad altre definizioni (addensamenti, asimmetrie). Il 32% dei laboratori dichiara di eseguire la quantificazione solo se la CM è ben separata e tipizzata, mentre il 23% la esegue anche in assenza di tipizzazione purché sia ben separata. Il 12% dei laboratorio esegue la quantizzazione solo se esplicitamente richiesta, il 22% la esegue sempre e il restante 11% non la esegue mai. L'88% dei partecipanti ha dichiarato di reputare utile la standardizzazione delle modalità di refertazione della SPE.

Conclusioni. I dati raccolti e la discussione in aula consentono di suggerire che il referto dovrebbero includere un commento specifico che indichi con chiarezza l'assenza di CM. In caso contrario, la CM deve essere definita come tale evitando altre definizioni. La quantificazione delle CM deve essere effettuata al suo primo rilevamento e durante il monitoraggio e deve essere sempre espressa in concentrazione.

Si ringraziano tutti i colleghi che hanno risposto al questionario e che, con una vivace e partecipata discussione in aula, hanno reso possibile la realizzazione di questo lavoro.

219

**CASE REPORT: MIELOMA MULTIPLO IN GIOVANE
ETA' (24 ANNI)**

M. Falcone¹, S. Petti¹, M.A. Prencipe¹, F. Simone¹, S. Capalbo²

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

²SC Ematologia

Un giovane è arrivato al Pronto Soccorso degli OO.RR. di Foggia per grave astenia, ripetuti lipotimie in casa e dolori alla schiena. Ricoverato in Medicina Uomini ha proseguito le indagini. La diagnosi di ingresso è stata anemia emolitica. I risultati dei primi esami mostravano anemia, LDH alto, creatinina elevata, calcio basso. L'elettroforesi siero-proteica (EP) ha mostrato una Componente Monoclonale evidentissima: 59.87%, 7.6 g/dl, Prot. tot. 12.7 g/dl. Con l'IFE si tipizzava la CM come IgG Kappa. L'EP-U mostrava una CM elevata in gamma e una modesta banda albumina. L'IFE-U identificava una CM Kappa. Questo caso appare rilevante per l'età di esordio e per l'avanzamento della malattia. Altri casi curati negli ospedali limitrofi non hanno mai riportato un caso di MM inferiore a 30 anni. Il giovane paziente, trasferito in Ematologia, è stato inserito nel protocollo terapeutico: velcade, desametasone, talidomide. I primi dati dell'EP in gel d'agarosio (Ditta Alfa Wassermann) mostrano una iniziale risposta alla terapia. Si riportano i valori della CM e di Prot. T in g/dl (CM/Pt), dopo il terzo dosaggio si assiste ad un significativo calo della CM. I dati riportati sono relativi ai primi 25 giorni di cura: 7.6/12.7- 7.73/13.1- 7.24/12- 4.38/8.7- 4.12/8.1- 4.35/8.8. Anche l'EP-U ha mostrato una modifica. Il tracciato a 25 giorni riporta in gamma due vistose CM ben separate che l'IFE-U ha tipizzato CM Kappa. La proteinuria non si è abbassata in modo significativo. Conclusione e discussione. La comunicazione ha lo scopo di mostrare il peso che conserva l'EP e l'IFE del siero e delle urine, esami relativamente semplici che aprono scenari diagnostici insospettabili. Ben suggeriscono le linee guida SIBioC che inseriscono l'EP come esame da eseguire al momento del ricovero. L'EP trova un suo valido impiego anche nel monitoraggio terapeutico, come mostrano i primi dati. La giovane età di esordio sorprende, il MM è riportata essere una malattia dell'età adulta anziana, questo caso, come altri pubblicati, sono eccezioni o il MM si sta spostando verso la giovane età?

Bibliografia

Chen CC, Gau JP, Ho CH. Aggressive multiple myeloma with brain involvement in young patient. J Chim Med Assoc. 2003 Mar; 66(3):177-80

220

**LA PRESENZA DEL FIBRINOGENO NEL SIERO
INTERFERISCE NELL'ELETTROFORESI PROTEICA,
UN METODO RAPIDO PER ELIMINARE LA BANDA
DEL FIBRINOGENO**

M. Falcone¹, S. Petti¹, M.A. Prencipe¹, F. Simone¹

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

La presenza di fibrinogeno nel siero interferisce nell'elettroforesi proteica (EP). Il fibrinogeno può essere presente in provette sierologiche in pazienti con diverse patologie o per terapie. Nell'EP la banda del fibrinogeno, se presente, appare nel punto d'incontro beta-gamma, come una Componente Monoclonale, ma l'Immunofissazione (IFE) non risulta positiva, mentre un'IFE con anticorpi anti-fibrinogeno rivela la presenza del fibrinogeno.

Presso il 1° Laboratorio circa 3% dei campioni di siero del SIT e il 5% dei campioni di Nefrologia – Dialisi mostrano la banda in beta-gamma da fibrinogeno.

Per eliminare tale artefatto si procede a un trattamento del campione con metanolo a freddo: a 250 ul di siero si aggiungono 30 ul di metanolo, segue un'incubazione di 15 min in ghiaccio fondente, centrifugazione a 4 C°. Il sovrinatante (35 ul) è pipettato nel portasieri e segue l'EP. Dopo tale procedura la banda del fibrinogeno in beta-gamma scompare. L'EP è eseguita con tecnologia in gel d'agarosio della Ditta Alfa-Wassermann. Il medesimo trattamento è stato eseguito su siero con vera CM (kappa in beta-gamma) e il tracciato non si è modificato. Sono stati eseguiti altri controlli per verificare l'accuratezza e l'effetto diluizione. Discussione e conclusione. Se si osserva una banda anomala in beta – gamma bisogna ipotizzare la contaminazione del siero da fibrinogeno. Il trattamento con metanolo a freddo elimina le tracce di fibrinogeno nel siero e l'EP del siero non evidenzia più la banda anomala. I sieri del SIT, che mostrano tale banda, provengono da donatori. Tale procedura migliora la qualità del lavoro, evita la ripetizione del prelievo. I donatori devono essere richiamati, ma ciò potrebbe generare delle ansie che talvolta i medici del SIT hanno registrato. Il lavoro citato espone l'utilizzo dell'etanolo, mentre nel 1° Lab. si è utilizzato il metanolo. Dai dati ricavati, si dimostra che l'uso del metanolo sembra idoneo.

Bibliografia

Ling L., Stanley S. Levinson, Convenient and Effective method for Removing Fibrinogen from Serum specimens before protein electrophoresis. Clinical Chemistry 2003;49(6):868-72.

221

LA SINERGIA MEDICINA DI LABORATORIO/CLINICA NELLA DEFINIZIONE DELL'APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA DI RICERCA DELLA PROTEINURIA DI BENCE JONES AI FINI DEGLI ESAMI CONTRASTOGRAFICI

T. Lupo¹, I. Pascucci¹, E. Caracciolo¹, E. De Sisto¹, L. Pappalardo²

¹Dip. Ass. di Medicina di Laboratorio Azienda Ospedaliera Universitaria "Federico II" Università degli Studi di Napoli

²Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica Università degli Studi di Napoli

La valutazione dell'appropriatezza della richiesta di ricerca della Proteina di Bence Jones (BJ) ai fini degli esami contrastografici, sulla base delle indicazioni fornite dalle Linee Guida SIBioC e dalla Società Italiana di Radiologia Medica, è stato l'obiettivo di un precedente lavoro: le conclusioni suggerivano di concordare, con i colleghi clinici, un nuovo percorso diagnostico finalizzato all'integrazione fra appropriatezza e ottimizzazione delle risorse. La strategia adottata ha previsto il coinvolgimento e, quindi, la sinergia dei colleghi radiologi e clinici, nonché della Direzione Sanitaria Aziendale.

È stata inviata, quindi, alla Direzione Sanitaria una nota, a firma congiunta dei primari dei Dipartimenti di Medicina di Laboratorio e di Diagnostica per Immagini, per l'opportuna informazione; la Direzione Sanitaria ha inviato a tutti i Direttori dei Dipartimenti Clinici dell'Azienda la lettera dei due primari con una nota di accompagnamento. Al fine di promuovere una informativa più capillare, questa stessa è stata inviata, successivamente, ai Direttori dei Dipartimenti Clinici anche a cura del Laboratorio.

Ad un mese dal primo invio della nota è stata effettuata una preliminare valutazione dell'andamento delle richieste di BJ: i risultati ottenuti hanno evidenziato una riduzione delle richieste pari al 34%, rispetto ad un mese scelto come riferimento per la stabilità del numero di ricoveri.

A distanza di un altro mese è stato valutato di nuovo l'andamento del numero delle richieste, i dati sono stati confrontati con il mese di riferimento: la riduzione del numero di richieste è stata calcolata nell'ordine del 53%.

Infine sono stati confrontati i dati relativi al mese di giugno 2008 versus giugno 2007: il decremento delle richieste si conferma del 56.5%.

Pertanto, possiamo concludere di aver raggiunto l'obiettivo di ridurre il numero delle richieste non appropriate perseguendo sia la strategia della condivisione della problematica con i colleghi di altre discipline Diagnostiche e con i colleghi clinici sia il percorso dell'informazione capillare. Continuerà, comunque, il monitoraggio delle richieste.

Bibliografia

Lupo T et al. Le richieste di ricerca della proteinuria di BJ ai fini degli esami contrastografici. Esperienza di un laboratorio. 39° Congresso SIBioC 2007.

222

CREATININE CALIBRATION AND CKD STAGING

D. Leonardis¹, F. Pascarelli², A. Pisano¹, F. Catalano¹, G. Tripepi¹, F. Meduri², C. Zoccali¹

¹CNR-IBIM Sez. di Epidemiologia Clinica e Fisiopatologia delle Malattie Renali e dell'Ipertensione Arteriosa di Reggio Calabria

²Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedali Riuniti di Reggio Calabria

Introduction. K-DOQI guidelines classification system of chronic kidney diseases (CKD) is based on estimated glomerular filtration rate (eGFR) derived from MDRD study equation (Levey et al. JASN 2000) The high variability of creatinine assays is an objective limitation for the universal adoption of this staging system. Calibration to a single standardized serum creatinine based on GC or LC-IDMS (Gas or Liquid Chromatography -Isotope Dilution Mass Spectrometry) produces the most careful estimations (G.L. Myers et al. Cl. Chemistry 2006).

Aims. We compared the creatinine values measured by different methods with those based on enzymatic method recalibrated to be traceable to IDMS at NIST (National Institute of Standards and Technology) and tested the agreement between GFR as estimated by the MDRD186 (uncalibrated) and the MDRD175 (calibrated) formulas. (Levey et al. Cl. Chemistry 2007).

Methods. We assayed 751 independent samples of stage 1-5 CKD patients (age 62±11 years ; 450 M e 301 F). The agreement between calibrated and uncalibrated creatinine values and between the two eGFR equations (MDRD186 and MDRD175) was tested by correlation analysis, kappa statistics and the Bland-Altman plots.

Results. Calibrated serum creatinine levels were higher (2.6±1.3 mg/dl) than uncalibrated ones (2.1±0.9 mg/dl) (P<0.01). Accordingly, the GFR-MDRD175 (30±15 ml/min/1.73 m²) was lower than the GFR-MDRD186 (36±14 ml/min/1.73 m²) and the correlation coefficient was <1 (r= 0.86, P<0.001). Furthermore, the CKD stage classification analysis revealed a poor agreement between the GFR-MDRD186 and GFR-MDRD175 (kappa statistics: 0.36±0.03) while the Bland-Altman plots identified 24 patients (3%) with differences in GFR estimates exceeding 2SD(±13 ml/min/1.73 m²).

Conclusions. CKD staging is fundamental for prevention programs. Given the important misclassification introduced by uncalibrated creatinine measurements, creatinine calibration should be universally adopted in pathology laboratories.

223

DIFFERENCES BETWEEN GFR ESTIMATION BY AN EQUATION BASED ON CREATININE AND ONE BASED ON CYSTATINE C

D. Leonardis¹, A. Itri², P. Gasparone², A. Pisano¹, F. Catalano¹, G. Tripepi¹, F. Meduri², C. Zoccali¹

¹CNR-IBIM Sez. di Epidemiologia Clinica e Fisiopatologia delle Malattie Renali e dell'Ipertensione Arteriosa di Reggio Calabria

²Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedali Riuniti di Reggio Calabria

Introduction. Creatinine based equations are recommended by current guidelines (K-DOQI) as the best method to measure renal function. However, serum creatinine is highly affected by age, sex, race and other factors. Serum cystatine C is considered as a more accurate and precise marker than serum creatinine (Dharnidharka VR, Meta-analysis. *AJKD* 2002) as well as a stronger predictor of mortality than GFR as measured by iothalamate (Menon V et al. *Ann I Med* 2007).

Aims. We tested the agreement between GFR measurements as estimated by the creatinine-based MDRD formula [$186 \times (\text{SCr})^{-1.154} \times (\text{age})^{-0.203} \times (0.742 \text{ if female}) \times (1.210 \text{ if African-American})$] (Levey et al. *JASN* 2000) and by a cystatine-based formula [$66.8 \times (\text{cystatine C})^{-1.30}$] (Rule A.D et al. *Kidney Int*, 2006).

Methods. We assayed 517 independent samples of stage 3-4 CKD patients (age 62 ± 10 years, 312 M e 205 F) in 24 Nephrology Centres. Creatinine values were measured by different methods and cystatine C was determined by an established immunonephelometric method (Dade Behring, Marburg)]. The agreement between the two eGFR equations (MDRD and cystatine-based formula) was tested by correlation analysis and Bland-Altman plot.

Results. Creatinine-based GFR-MDRD ($36 \pm 14 \text{ ml/min/1.73m}^2$) was on average similar to cystatine-based GFR ($35 \pm 18 \text{ ml/min/1.73m}^2$) but the two estimates were poorly correlated ($r^2 = 0.49$, $P < 0.001$) and the scattering of values was high. Furthermore the Bland Altman plot indicated that in 24 patients (5%) the deviation of the combined estimate of two measures exceeded 2 SD ($25 \text{ ml/min/1.73 m}^2$).

Conclusions. There are important differences between GFR as estimated by creatinine-based MDRD formula and the cystatine-based formula. Studies are needed to establish which of the two approaches is better associated with renal and cardiovascular outcomes in CKD patients.

224

RUOLO DELL'ALDOSTERONE NELLA SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO

C. Cosma¹, D. Faggian¹, A. Tasinato¹, A. Andrisani², C. Fiore³, G. Ambrosini², A. Decio³, M. Plebani¹

¹Dip. di Medicina di Laboratorio, Università di Padova, Italia

²Dip. di Ginecologia e di Scienze Riproduttive Umane, Università di Padova, Italia

³Dip. di Scienze Mediche Chirurgiche, U.O. Endocrinologia, Università di Padova, Italia

Introduzione. La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è una delle più comuni sindromi endocrino-metaboliche che colpiscono le donne in età riproduttiva. Recenti studi hanno dimostrato concentrazioni di aldosterone oltre i livelli di normalità nella fase prefollicolare del ciclo mestruale in pazienti affette da PCOS.

Scopo dello Studio: Lo scopo dello studio è quello di valutare concentrazioni plasmatiche di aldosterone e di progesterone nelle tre diverse fasi del ciclo mestruale (7°, 14° e 21° giorno).

Materiali e Metodi. In questo studio è stato valutato un gruppo di 30 donne, 15 affette da PCOS e 15 sane, appaiate per età e BMI, considerate come gruppo di controllo. I criteri di inclusione sono segni clinici o biochimici di iperandrogenismo, oligomenorrea e ovaie policistiche con esclusione di altre patologie. Le pazienti incluse in questo studio sono state informate e hanno aderito con il loro consenso informato. Tutte sono state sottoposte ad esami ormonali e biochimici.

Risultati. I livelli di aldosterone sono significativamente più alti nelle donne affette da PCOS rispetto al gruppo di controllo sano in tutte e tre le fasi del ciclo. L'aldosterone risulta più alto nelle donne con PCOS che non ovulano rispetto al gruppo di controllo sano che non ovula sia nella fase estrogenica che in quella progestinica. I livelli di progesterone non sono risultati significativamente differenti tra le pazienti. Il rapporto progesterone/aldosterone è risultato essere più basso nel gruppo di donne con PCOS rispetto al gruppo di controllo sano sia in fase estrogenica che luteinica.

Conclusioni. Il rapporto progesterone/aldosterone può essere ritenuto un marker dell'azione di aldosterone. Un aumento dei livelli di progesterone nella fase lutenica può essere considerato un meccanismo di protezione verso l'azione dell'aldosterone, essendo il progesterone un antagonista a livello dei recettori dei mineralcorticoidi. Il rapporto progesterone/aldosterone risulta essere più basso nelle pazienti con PCOS che non hanno ovulato, rispetto ai controlli sani che non hanno ovulato, sia nella fase estrogenica che in quella progestinica.

Bibliografia

1. Katz FH, Romfh P. Plasma aldosterone and renin activity during menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1972;34(5):819-821.

225

CHRONIC ASSUMPTION OF STATINS INCREASES THE AVAILABILITY OF SELENIUM IN THE ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEMS IN HEMODIALYSIS PATIENTS

M. Dessi¹, C. Fabbri¹, A. Noce², M. Taccone-Gallucci², G. Federici¹, L. Franzò¹, I. Giambini¹, P. Casalino¹, P. Bertucci¹

¹Laboratory Medicine, Tor Vergata, University, Rome, Italy

²Nephrology, Internal Medicine, Tor Vergata, University, Rome, Italy

Oxidative metabolism in aerobic organisms leads to the generation of free radicals (reactive oxygen species, ROS). In humans, there are at least three groups of antioxidant enzymes: superoxide dismutases (SODs), catalases and glutathione peroxidases (GSH-Pxs). Selenium bound to the active sites of GSH-Px plays a critical role in this antioxidant defense system, indirectly participating in elimination of ROS. Oxidative stress is enhanced in hemodialysis (HD) patients, who have an increased incidence of cardiovascular disease (CVD), amyloidosis associated with protein modification and changes in both function and structure of many cellular components. Statins are widely used and extensively investigated in the prevention of CVD, notably in high-risk subjects. Several studies suggest that statins show antioxidant effects, protecting low-density lipoproteins from oxidation. Aim of our study was to compare serum selenium concentration in ESRD patients on maintenance HD and in homogeneous healthy subjects and to investigate whether chronic assumption of statins may interfere with serum Se concentration in HD patients.

A total of 103 HD patients and 69 healthy subjects were enrolled; HD patients were then divided into patients who were not treated with statins (32 pts, group A) and patients who assumed statins since six months at least (71 pts, group B). Serum selenium was determined by atomic absorption spectrometry, a commonly used technique for the determination of trace element concentrations in various samples. Serum selenium was determined by graphite furnace atomization and atomic absorption spectrometry using Zeeman background correction, equipped with selenium single element hollow cathode lamp, a THGA graphite tube furnace and an automatic sampler. Serum selenium was significantly lower in HD patients of group A compared to healthy subjects ($81.7 \pm 19.7 \mu\text{g/L}$ Vs. $96.4 \pm 15.6 \mu\text{g/L}$, $p < 0.004$). However, in HD patients who assumed statins serum selenium was significantly higher than in HD patients who did not ($111.8 \pm 18.8 \mu\text{g/L}$ Vs. $81.7 \pm 19.7 \mu\text{g/L}$, $p < 0.0001$). Hence, our results suggest that in HD patients chronic assumption of statins is related to a higher availability of active antioxidant agents and reduced oxidative stress.

226

OXIDATIVE STRESS IN CHRONIC RENAL FAILURE IN OLD PATIENTS: EFFECTS OF DIFFERENT RENAL REPLACEMENT THERAPIES ON CELL MEMBRANE FLUIDITY

G. Goi¹, L. Massaccesi¹, C. Baquero Herrera¹, C. Musetti², S. Bertoli³, D. Cusi⁴

¹Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Biotechnology, University of Milan, Italy

²Grad School of Nephrology, Univ of Milano, Div of Nephrology, IRCCS Multimedica, Sesto S. Giovanni, MI, Italy

³Div of Nephrology, IRCCS Multimedica, Sesto S. Giovanni, MI, Italy

⁴Chair & Grad School of Nephrology, Univ of Milano, Div of Nephrology, S. Carlo Borromeo Hospital, MI, Italy

Renal replacement therapies (RRT) produce partial loss of some antioxidant molecules (1) and formation of Reactive Oxygen Species (ROS)(2) one of the major factor involved in the alterations of plasma membrane fluidity and endothelial activation. We compared erythrocytes' plasma membrane fluidity, plasma hydroperoxides and total plasma antioxidant capacity (Lag-Time) in patients aged 50 or older, with CRF, on peritoneal dialysis (PD) and on hemodialysis, immediately before (HD-pre) and after (HD-post) an hemodialysis treatment, and in apparently healthy age-matched controls, to evaluate the role of different RRTs in aged patients on oxidative stress and plasma membrane fluidity.

Hydroperoxides were higher in CRF, PD and HD-post (only significant in PD), whereas Lag-time was specularly and significantly lower in PD, CRF and in HD-post. HD-pre was never different from controls. This notwithstanding, we found that CRF, PD and HD-pre had also a higher membrane fluidity (rsDPH), compared to HD-post and controls. These findings are in keeping with the hypothesis that the Lag-time decrease is due not only to the effect of the RRT but also to the uremic state and that PD patients undergo a chronic, larger oxidative stress. Contrary to the expectation all patients showed larger erythrocyte membrane fluidity which can be attributed to uremic toxicity. These observations reinforce the hypothesis that oxidative stress is an intrinsic component of this disease state and indeed is already present also in CRF not yet requiring renal replacement treatment. The reduced membrane fluidity of phospholipids head groups shown after hemodialysis is probably due to the extracorporeal circulation, with a surface temporary injury of the erythrocytes plasma membrane: uremic toxins or other RRT-related factors could be responsible for the subsequent increased membrane fluidity.

In conclusion, we confirm in this population a change in membrane fluidity with a probable endothelial activation due to a high oxidative stress, chronic inflammation and uremia "per se". Moreover, hemodialysis treatment seems to be the least oxidating option for RRT in older patients.

- References
1. Vaziri ND et al. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13:93-99.
 2. Morena M et al. *Hemodial Int* 2005;9:37-46.

227

BLOOD LIPIDS, HOMOCYSTEINE, URIC ACID AND VITAMINS IN CLINICALLY STABLE MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

M.C. Gueli¹, F. Battaglieri², E. Guglielmini³, P. Ragonese², G. Salemi²

¹Dip. di Scienze Biochimiche, Policlinico, Università di Palermo, Italy

²Dip. di Neuroscienze Cliniche, Policlinico, Università di Palermo, Italy

³Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Legale, Policlinico, Università di Palermo, Italy

Introduction. A decrease of antioxidants, of neuroprotective and immunoregulatory vitamins and an increase of total-Homocysteine, Cholesterol, HDL-cholesterol, and of cellular stress markers [1] was reported in patients affected by Multiple Sclerosis. Recently, considering their unreliability, mainly due to the variability of the samples investigated, the attention focused on clinical relapse that results associated to a decrease of Uric acid and an increase of Cholesterol and stress markers.

Aim. To identify the biochemical status during Multiple Sclerosis (MS) in a phase of clinical stability (PCS), we compared the blood levels of Uric acid (UA), Folic acid (FA), vitamins B12, A, and E, total-Homocysteine (t-Hcy), total-Cholesterol (CHL), HDL-CHL, and Triglycerides (TG) in 20 MS stable patients with those of 40 healthy controls. **Methods.** Consecutive MS patients, with relapsing-remitting or secondary-progressive courses, in a (PCS), were included. Plasma t-Hcy levels were determined by Ubink method. Technicon Immuno autoanalyser was used for serum FA and vitamin B12 assays. HPLC and fluorometry were used for UA, vitamin A and E, CHL, HDL-CHL, and TG assays. The ratio of E/CHL was valued.

Results and Discussions. We found that MS patients in a PCS have higher blood levels of vitamin B12, t-Hcy, CHL, and HDL-CHL and lower blood levels of vitamin E and of the ratio E/CHL. The blood level of UA, FA, vitamin A, and TG do not differ from controls during this phase of MS. The increased level of CHL could be expression of both an its increased synthesis by neural cells and a chronic damage of myelin and axons. HDL-CHL concentration might arise to counteract the increase of CHL and assure its transport to the liver. Plasma levels of vitamin E, the major hydrophobic chain-breaking antioxidant, are decreased and our data confirm and support the view that it is consumed to counterbalance MS chronic neurodegeneration. Also, the increased levels of t-Hcy and vitamin B12 match previous studies performed in MS patients outside relapse. No significant differences in UA, FA, vitamin A, and TG levels appeared, making unprobable their involvement in the degenerative process of the stable phase of MS.

Reference

1. Gilgun-Sherki Y et al. J Neurol 2004;251:261-8.

228

USO DI BEMIPARINA SODICA NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE (TAO). NOSTRA ESPERIENZA CLINICA

R. Lovero¹, M. Pepe¹, P. Ciola¹, A. Carucci¹, F. Cesareo¹, E. Vinci¹

¹U.O.C. Laboratorio di Analisi di Chimica Clinica, Fasano Ostuni Cisternino (BR)

Introduzione. Ad oggi non c'è un consenso unanime sul management dei pazienti in TAO che devono essere sottoposti a procedure chirurgiche. L'efficacia e la sicurezza della terapia sostitutiva con eparina a basso peso molecolare (EBPM), nella pratica clinica, non sono supportati da studi clinici che abbiano individuato un regime di terapia anticoagulante standardizzato ma solo da raccomandazioni emanate dalla FCSA (2005). La bemiparina sodica è una EBPM, di seconda generazione, con un peso molecolare di 3600 Da, e un maggiore rapporto attività antiFXa/antiFIIa.

Scopo del lavoro. E' stato quello di valutare la compliance del trattamento con Bemiparina sodica rispetto ad altre EBPM in paziente in TAO sottoposti a trattamento chirurgico o a trattamento odontoiatrico.

Materiali e metodi. Nel corso del 2007 presso il nostro Centro di Sorveglianza sono stati reclutati 84 pazienti adulti, 50 maschi e 34 donne, di età media 68,4 (range 60-76.8) che avevano interrotto la TAO per essere sottoposti a procedure chirurgiche. Di questi pazienti 38 dovevano essere sottoposti a biopsia, 46 ad estrazioni dentarie. Come terapia sostitutiva è stata utilizzata la Bemiparina sodica mono somministrazione su 19 pazienti sottoposti a biopsia e 23 ad estrazione dentaria; gli altri sono stati trattati con Enoxaparina sodica in due somministrazioni giornaliere. Sono stati valutati gli indici di funzionalità epatica e la conta piastrinica. I singoli pazienti hanno riferito episodi di gengivorragia, ematomi spontanei, ematomi in sede di inoculo del farmaco, episodi emorragici post operatori.

Risultati. Dei pazienti in trattamento con Enoxaparina sodica il 4% presentava una riduzione della conta piastrinica, mentre il 2% riferiva episodi di gengivorragia ed ematomi in sede di inoculo del farmaco. Dei pazienti in trattamento con Bemiparina sodica soltanto il 3% presentava ematomi spontanei.

Conclusioni. Il minor numero di eventi indesiderati garantisce una migliore compliance da parte dei pazienti nei confronti di questa nuova EBPM. La mono somministrazione della Bemiparina sodica, che ha portato un maggior consenso da parte dei pazienti, è garantita dalla attività plasmatica massima antiFXa che viene raggiunta in 2-4 ore ed è presente fino a 12-18 ore dalla somministrazione.

229

DETERMINAZIONE RAPIDA DELLE DROGHE D'ABUSO IN URGENZA: CONFRONTO TRA IL METODO CEDIA vs IL METODO RAPIDO IMMUNOLOGICO

S. Mazzolini¹, A. Colatutto¹, B. Marcon¹, L. De Luca¹, L. Isola¹, R. Zaglia¹, G. Barbina¹, N. Pradal¹, E. Arnoldo¹, A. Daminato¹, R. De Martini¹, P. Sala¹

¹Laboratorio Analisi Elezione Az. Osp. Univ S. Maria della Misericordia, Udine

Scopo del lavoro. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di mettere a confronto due metodi per lo screening delle droghe d'abuso su urine (amfetamine, benzodiazepine, cocaina, cannabinoidi, oppiacei, metadone) ovvero il metodo Rapid Drug Screen (ARNIKA) vs il metodo immunologico competitivo (Microgenics) su strumento Ilab 650 per valutare la concordanza tra le due metodiche.

Materiali e Metodi. Abbiamo confrontato le urine di 150 pazienti con metodo Rapid Drug Screen ARNIKA vs i test semi-quantitativi CEDIA e DRI sullo strumento ILab 650 di Instrumentation Laboratory per valutare la specificità e la sensibilità delle due metodiche ed il loro ottimale utilizzo in regime d'urgenza.

Risultati. I dati analizzati confermano una buona correlazione tra i due metodi: per la cocaina il 31% dei campioni era positivo al test rapido ARNIKA e nel 69% dei casi vi era concordanza tra i due metodi, per i cannabinoidi nel 65% dei casi vi era concordanza mentre nel 35% vi era positività solo del test rapido, per il metadone la concordanza era del 87% con il 13% di positività per il test rapido, per gli oppiacei nell'83% vi era concordanza mentre il 15% di positività solo ARNIKA e il 2% solo Ilab, per le benzodiazepine nel 54% vi era concordanza mentre nel 23% vi era una positività al test rapido e nel restante 23% per il test Ilab.

Discussione e Conclusioni. Allo stato attuale la tipologia di campione che viene più frequentemente utilizzata per la diagnostica tossicologica rimane l'urina, per la ripetibilità e non invasività del prelievo. In laboratorio di urgenza è essenziale che sia disponibile un test rapido e affidabile per la diagnostica tossicologica. Spesso questo risultato può assumere una rilevanza medico-legale pertanto è essenziale che vi sia consapevolezza dell'utilizzo di un metodo affidabile. Dal nostro studio emerge una sostanziale sovrapposibilità di risultati tra i due metodi che non si escludono a vicenda. Il metodo IL è preferibile in quanto è in grado di fornire una curva di calibrazione stabile nel tempo e un controllo di qualità affidabile. Pertanto una proposta operativa potrebbe essere quella di utilizzare il test rapido con eventuale conferma con metodo quantitativo ed eventuale processazione con il gascromatografo per casi dubbi o forensi.

Bibliografia

Maurer HH. LC/MS analysis of drugs of abuse. TIAFTnet On-line Reviews www.tiaft.org

230

VALUTAZIONE EPIDEMIOLOGICA DEL SISTEMA HM Jack (Kyowa Medex) PER LA RICERCA DEL SANGUE OCCULTO FECALE

T. Rubeca¹, G. Grazzini², G. Castiglione³, M. Confortini¹, L. Cilumbriello¹, S. Rapi⁴

¹U.O. Citologia Analitica e Biomolecolare, ISPO, Firenze, Italy

²U.O. Prevenzione Secondaria Screening CRR, ISPO, Firenze, Italy

³U.O. Diagnostica per Immagini, ISPO, Firenze, Italy

⁴Lab, Gen, Dip. Lab. A.O.U. Careggi, Firenze, Italy

Introduzione. Evidenze scientifiche dimostrano l'efficacia dello screening per il carcinoma colo-rettale (CCR) mediante ricerca del sangue occulto fecale (1). La valutazione delle specifiche clinico epidemiologiche dei metodi risulta fondamentale per l'efficienza complessiva dei programmi. Scopo dello studio è la valutazione delle performance del sistema HM-Jack (Kyowa Medex) mediante comparazione col sistema OC-Sensor micro (Eiken) attualmente utilizzato nello screening per il CCR della ASL di Firenze.

Materiali e Metodi. Entrambi i test si basano sulla determinazione della concentrazione dell'emoglobina umana mediante reazione immunometrica e lettura dell'agglutinazione indotta su particelle di lattice e non risultano soggetti ad interferenze alimentari. Nell'ambito del programma di screening è stato attivato un protocollo in cui a soggetti 50-70enni (n=1454) è stato richiesto, dopo consenso informato, di eseguire 2 distinti prelievi su uno stesso movimento fecale. Per ogni soggetto è stata effettuata una doppia determinazione della concentrazione di HB analizzando ogni tubo di prelievo sullo strumento dedicato, i soggetti positivi ad almeno uno dei due test sono stati invitati ad sottoporsi ad approfondimento diagnostico mediante colonscopia totale.

Nello studio è stato utilizzato un unico valore di cut-off di 100 ng/ml introducendo un fattore di correzione di 12.5 al valore fornito dal sistema HM Jack. Sono state valutate le performance dei 2 metodi in termini di tasso di positività, valore predittivo positivo (VPP), specificità e sensibilità relativa per cancro e per adenoma avanzato.

Risultati e Conclusioni. I dati raccolti mostrano per il sistema HM Jack una positività del 3.3%, un VPP e una sensibilità relativa (CCR+adenoma avanzato) del 44% a dell'81%, rispettivamente. Per il sistema OC Sensor Micro il tasso di positività è del 2.7%, il VPP e la sensibilità relativa (CCR+adenoma avanzato) pari al 45% e 67%, rispettivamente. Entrambi i sistemi mostrano una specificità del 98%. Questi dati suggeriscono una sostanziale sovrapposibilità delle performance dei 2 sistemi rispetto ai principali parametri rendendo ipotizzabile l'impiego in routine del sistema HM Jack senza variazioni significative di validità dei programmi di screening.

Bibliografia

1. Towler BP et al. Cochrane Database Syst Rev. 2007 Jan 24;(1).

231

EVIDENCES FOR A CLINICAL APPLICATION OF MEASUREMENT OF PLASMATIC CYSTEINYLGLYCINE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

B. Scanu¹, E. Pisanu¹, A. Zinellu¹, S. Sotgia¹, M. Sanna¹, L. Murgia¹, A. Mannu¹, D. Corraduzza¹, M.S. Marras¹, L. Deiana¹, C. Carru¹

¹Department of Biomedical Sciences, Chair of Clinical Biochemistry, University of Sassari

Several studies have reported that an increase in the levels of aminothiols, such as cysteine and homocysteine, is correlated with the risk of vascular disease. Differently, other thiols, as glutathione and its precursor cysteinylglycine (Cys-Gly), may have beneficial effects acting as antioxidants. Moreover Cys-Gly can have important functions in the atherosclerosis because it acts inhibiting the S-homocysteinylated LDLs formation (1). There are a large number of methods for plasma thiols determination but RIA and ELISA procedures focused on the measurement of homocysteine alone, while most HPLC, GC and CE assays have been developed to detect all plasma thiols in the same run with a waste in time and costs. For this reason we developed a new ultra-rapid assay to measure thiols and in particular with the capillary length of 47 cm, temperature of 45°C and using 3mmol/L sodium phosphate/2,5 mmol/L boric acid as electrolyte solution with 75 mmol/L N-methyl-D-glucamine at pH 11,25 in about 2 min we obtained a baseline separation between Cys-Gly, Hcy and Cys peaks. Comparing our method with the recent rapid HPLC method described by Frick et al. (2) it is plain that the capillary electrophoresis method allows to reduce both pre-analytical and analytical times. The method was tested by measuring Cys-Gly levels in a group of patients affected by retinal venous occlusive disease (RVO) which is an important cause for moderate to severe visual loss in older people. We found that RVO patients had significant lower levels of Cys-Gly compared to the control group. The difference in Cys-Gly concentration may lead to more homocysteinylated LDL in RVO subjects, thus contributing to vascular damage. In conclusion, the simplicity in sample preparation, the quickness in the analytical times and the low costs of our proposed method make it a reliable tool for clinical laboratories or research group when an elevated number of sample must be analyzed daily.

References

1. Zinellu A et al. Electrophoresis 2003;24:2796-804
2. Zinellu A et al. Clin Chem 2006;52:2054-9

232

SHBG (SEX HORMONE BINDING GLOBULIN): VALIDO INDICE DI ANOMALIE ANDROGENICHE?

D. Vandini¹, M.P. Mezzolani¹, M. Sudano², G. Bianchi¹, E. Pazzaglia¹, G. Pagnini¹, R. Guazzolini¹, V. Epifani¹, A. Pierleoni¹, A. Bolognini¹

¹U.O. Lab. Analisi Osp. Urbino, ASUR ZT2, Urbino

²U.O. CAD Osp. Urbino, ASUR ZT2, Urbino

La determinazione serica di SHBG, glicoproteina legante gli ormoni steroidei, rappresenta un ulteriore strumento per la corretta valutazione dell'attività androgenica maschile. La sola misura del testosterone totale (T) risulta di non facile interpretazione; i livelli di SHBG si rendono indispensabili per l'introduzione nella pratica clinica dell'uso di testosterone libero calcolato, secondo Vermeulen, e dell'indice androgenico libero (FAI).

Lo studio è basato sulla determinazione serica di T, Albumina e SHBG su un gruppo di 60 soggetti di sesso maschile (41-78 anni, 31 sani, 29 diabetici); T su UniCel DxI 800 (Beckman-Coulter), SHBG su IMMULITE 2000 (SIE-MENS), Albumina su Vitros 5,1 FS (J&J), testosterone libero e biodisponibile calcolati usando calcolatori presenti in rete.

Dall'analisi statistica è emersa una correlazione positiva tra T e SHBG sulla intera popolazione ($r=0,74$ $p<0,00001$), sulla popolazione diabetica ($r=0,83$ $p<0,00001$) e sulla popolazione sana ($r=0,64$ $p<0,00001$). I valori di T nella popolazione sana risultano tra 2,06 e 8,32 ng/dl e nella popolazione diabetica tra 2,09 e 8,19. L'indice FAI calcolato, nella popolazione sana è tra 6,57-31,5%, nella popolazione diabetica tra 9,8-33,1%. Nella intera popolazione la correlazione tra T e indice FAI è risultata negativa ($r=-0,62$ $p<0,00001$). Nella popolazione diabetica la correlazione tra testosterone libero calcolato e Indice di Massa Corporea (BMI) è risultata positiva ($r=0,29$ $p<0,00001$). La differenza critica calcolata per T è risultata essere uguale a 29%. Si è valutata altresì la "coerenza clinica" dei dati analitici, verificando l'eventuale presenza di correlazioni ben note in letteratura con dati desunti dall'esame obiettivo. Si è rilevata una correlazione negativa significativa fra BMI e T ($p<0,014$) e ai limiti della significatività ($p<0,06$) fra BMI e SHBG. In questa popolazione di diabetici NID la percentuale di testosterone libero calcolato mostra una forte correlazione positiva con BMI ($r=0,29$, $p<0,00001$), verosimilmente come risposta compensativa al calo del testosterone totale BMI-correlato. Il dosaggio di SHBG, indispensabile per la determinazione del testosterone biodisponibile, nel nostro campione si è rilevato affidabile e ben correlato ad un indice clinico come il BMI.

Bibliografia

Luppa P, Neumeir D. Effects of SHBG on extraction immunoassay for testosterone. Clin Chem 1990;36.

233

PREVALENCE OF C677T AND A1298C MUTATIONS OF 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) IN ITALIAN NEWBORNS FROM THE MOLISE AREA

B. Zappacosta¹, L. Romano¹, S. Persichilli², L.A. Cutrone³, M. Graziano¹, A. Vitrani¹, A. Di Castelnuovo⁴, B. Giardina², P. Mastroiavoco⁵

¹Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche Giovanni Paolo II, Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

²Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

³U.O.C. Pediatria, Neonatologia e T.I.N. Ospedale "A. Cardarelli", Campobasso

⁴Laboratori di Ricerca Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche "Giovanni Paolo II", Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

⁵Alessandra Lisi International Centre on Birth Defects, Roma

Background. the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme of the homocysteine metabolism; a MTHFR impaired activity can derive from some common mutations in the MTHFR gene such as the C677T and A1298C.

The 677TT genotype can result in hyperhomocysteinemia and has been frequently associated with cardiovascular disease, congenital birth defects, pregnancy complications and cancer.

Objective. To evaluate the prevalence of the polymorphisms C677T and A1298C of MTHFR in a newborn population from a restricted area of middle-southern Italy and to compare it with data obtained in other Italian regions.

Subjects and methods. 104 newborns from the General Hospital "A. Cardarelli" in Campobasso (Molise, Italy) were studied for the two MTHFR mutations. The C677T and A1298C polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP with Hinf I and Mbo II restriction endonuclease, respectively. **Results:** the 677TT and the 1298CC genotypes showed a frequency of 25.0% (95% C.I. 16.7-33.3) and 12.5% (95% C.I. 6.1-18.9) respectively; the frequency of the mutated alleles was 50.5% (95% C.I. 43.7-57.3) for the 677T and 32.7% (95% C.I. 26.3-39.1) for the 1298C. Furthermore, the analysis of the genotype combination shows a significant negative linkage disequilibrium ($R^2=0.82$; $P<0.0001$). **Conclusions.** the results of this study agree with similar studies performed in neighbouring areas, underscoring the higher prevalence of these genotypes in South of Italy.

234

OSTEOPONTIN PLASMA LEVELS INCREASE IN END-STAGE HEART FAILURE PATIENTS SUPPORTED BY LEFT VENTRICULAR ASSIST DEVICE IMPLANT

M. Cabiati², C. Caselli², R. Caruso⁴, S. Del Ry¹, V. Sedda⁴, S. Turchi¹, F. Milazzo³, T. Colombo³, D. Giannessi¹, O. Parodi⁴

¹CNR Institute of Clinical Physiology, Fondazione G. Monasterio, Pisa, Italy

²Scuola Superiore S. Anna, Pisa, Italy

³Dipartimento di Cardiocirurgia, Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano, Italy

⁴CNR Institute of Clinical Physiology, Milano, Italy

Introduction. Heart failure (HF) is one of the leading causes of death in industrialized countries. In the last years, left ventricular assist device (LVAD) are used as bridge to heart transplantation in patients with end-stage HF waiting for a donor heart. Recovery and cardiac regeneration in LVAD patients are not predictable and reliable predictive biomarkers are so far lacking. Osteopontin (OPN), an extracellular matrix phosphoglycoprotein, involved in tissue regeneration, inflammation, fibrosis and remodeling, could be a potential marker of recovery in LVAD patients. **Aim.** To assess OPN plasma concentrations in terminal HF patients who required LVAD in order to evaluate its possible changes during mechanical unloading.

Material and methods: we studied 5 end-stage HF patients (NYHA class III and IV; age: 57 ± 11 yrs; $LVEF\%<20$) undergoing LVAD implantation. Clinical hemodynamic evaluation and blood samples were obtained at admission (T1) and at 4, 24, 72 hrs and 1, 2, 4 weeks (T2-T7) after LVAD implant. As control 50 healthy subjects were studied. OPN was measured in plasma EDTA samples by an enzyme immunometric assay (EIA) kit (Assay Designs, Inc.). NT-proBNP levels were evaluated as cardiac function marker by the Elecsys® 2010 analyzer (Roche Diagnostics).

Results. OPN plasma concentrations were significantly higher in end-stage HF patients compared to healthy subjects (89.5 ± 34.3 ng/ml vs 20.8 ± 1.4 ng/ml; $p<0.0001$, T1 vs controls). After LVAD implantation OPN concentrations increased further on (T6: 185.9 ± 55.4 ng/ml, $p=0.03$ vs T1) without a significant time-course. No significant correlations between plasma OPN and NT-proBNP, pulmonary artery pressure or hepato-renal markers (urea, creatinine, bilirubin), both before and after LVAD implantation, were found.

Conclusions. These preliminary data indicates that OPN plasma levels are modulated by LVAD implantation, thus suggesting that OPN could represent a potential marker for the prediction of clinical outcome in end-stage HF patients supported by mechanical supports.

Reference

Milting H et al. Plasma Biomarkers of Myocardial Fibrosis and Remodeling in Terminal Heart Failure Patients Supported by Mechanical Circulatory Support Devices. J Heart Lung Transpl 2008;27(6):589-96.

235

PLASMA ADIPONECTIN IS A MARKER OF SEVERITY IN HEART FAILURE

C. Caselli², M. Maltinti¹, S. Del Ry¹, S. Turchi¹, C. Passino¹, M. Emdin¹, D. Giannessi¹

¹CNR Institute of Clinical Physiology, Fondazione G. Monasterio, Pisa, Italy

²Scuola Superiore S. Anna, Pisa, Italy

Purpose. Adiponectin, a 247 aminoacid protein produced mainly by adipose tissue, beside its effects on glucose metabolism, plays important protective function against cardiovascular disease. Adiponectin is inversely correlated with an increased cardiovascular risk and hypo-adiponectinemia is considered an independent cardiovascular risk factor. On the contrary, the role of adiponectin in heart failure (HF) is not fully known. In order to evaluate the prognostic value of circulating adiponectin, we measured total adiponectin plasma levels in patients with HF of different severity.

Methods. Total adiponectin, leptin and interleukin(IL)-6 levels were measured in plasma samples of 159 no diabetic patients with different etiology HF (17 in NYHA class I, 82 in NYHA class II, 46 in NYHA class III and 14 in NYHA class IV, age 62±14 yrs, LEVF% 32.5±0.79, mean±sem) and in 31 healthy subjects as control, by dedicated ELISA (Linco Res-US, DRG Diagnostics-Germany, Diaclone Research-France, respectively). In the same group brain natriuretic peptide (BNP) levels were determined by IRMA (Shionogi, Osaka, Japan).

Results. Our findings indicated that total adiponectin levels increased significantly as a function of disease severity (7.1±0.61 mg/ml vs 10.9±1.4 in NYHA class I vs 12.8±0.95 in NYHA class II vs 15.7±1.3 in NYHA III vs 16.7±1.8 in NYHA class IV; p<0.001 NYHA II, III and IV vs controls) and they correlated negatively with LVEF% (p=0.0009), positively with cardiac function (BNP levels) (p<0.0001) and inflammation (IL-6 levels) (p<0.0001). We did not observe any correlation with metabolism (BMI) in patients with HF, while a significant correlation was found between leptin and BMI (p<0.0001).

Conclusion. Circulating adiponectin is associated with cardiovascular function and inflammation in HF patients. The increased adiponectin plasma levels in HF is a marker of disease severity, independent of metabolism.

Reference

Kistorp C, Faber J, Galatius S, Gustafsson F, Fryssryk J, Flyvbjerg A, Hildebrandt P. Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005;112:1756-1762.

236

PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN (PSA) TO EVALUATE SEMEN CONTAMINATION OF VAGINAL FLUID

J.F. Culhane², P. Nyirjesy², K. McCollum², G. Casabellata¹, M. Di Santolo¹, S. Cauci¹

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

²Dept. Obstetrics and Gynecology, Drexel University, Philadelphia, PA, USA

Objective. Contaminants, such as semen, may affect measurement of vaginal cytokines. We sought to compare detection of semen contamination evaluated by prostate specific antigen (PSA) to other frequently used assays.

Methods. This study is part of a larger nested case control study about microbial and immune parameters associated with preterm birth among women with bacterial vaginosis (BV). At their first prenatal visit, participants were interviewed and their vaginal secretions were obtained. Swabs were Gram stained or inoculated into sterile saline and snap frozen. Among a subset of patients, semen contamination was assessed with: 1) measurement of total PSA, 2) acid phosphatase activity, 3) microscopic measurement of spermatozoa on Gram stain, and 4) self-reported sexual intercourse in the past two days. Sensitivity and specificity were calculated for each technique in comparison to PSA levels.

Results. Of the 802 study participants with BV, a subset of 302 samples were selected. Relevant demographic data were as follows: mean age of 24.1 years, 73.1% non-Hispanic black, 85.5% U.S. born, 76.4% single, 41.8% nulliparous, and 32.0% with less than high school education. The mean gestational age at collection was 11.8 weeks. A total of 119 (39.4%) study participants had any PSA detectable; 75 (28.6%) had PSA levels >1.0 ng/mL and 25 (9.5%) had levels >150 ng/mL. Spermatozoa were identified on Gram stain for 45 (15.2%) women, and 35 (11.6%) had elevated acid phosphatase levels. Sixty-nine (23.3%) women reported having had sexual intercourse in the previous 48 hours. Compared to measurable PSA levels, the sensitivity and specificity for each technique were as follows: acid phosphatase (26.9%, 98.4%), Gram stain (36.1%, 98.4%), and self-report (41.9%, 88.8%).

Conclusion. Compared to PSA levels, commonly used assays for recent semen exposure are inaccurate. This inaccuracy may affect the results of studies which measure vaginal immune factors like cytokines or retrieve DNA from vaginal specimens.

Reference

Culhane JF, Nyirjesy P, McCollum K, Casabellata G, Di Santolo M, Cauci S. Evaluation of Semen Detection in Vaginal Secretions: Comparison of Four Methods. *Am J Reprod Immunol* 2008 Jul 16. [Epub ahead of print]

237

A LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE EVALUATION OF INTESTINAL PERMEABILITY

A.M. Lostia¹, L. Lionetto¹, M. Torre¹, O. De Luca¹, L. Aimati¹, M. Borro¹, G. Gentile¹, A. Provenza¹, M. Simmaco¹

¹Dipartimento Scienze Biochimiche, UO Diagnostica Molecolare Avanzata (DiMA), II Facoltà di Medicina, Università La Sapienza, Roma

Background and Aim. The most widely accepted method for the evaluation of changes in intestinal permeability (IP) and monitoring the intestinal mucosa integrity is the measurement of the permeation of sugar probes following an oral dose administration [1,2]. The lactulose/mannitol (L/M) absorption test has been commonly used to measure IP. This non invasive test has been used in clinical practice for the estimation of several alterations of intestinal permeability in patients. We describe here a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS method for the measurement of these compounds in urine of children affected by abdominal recurrent pain (ARP).

Materials and Methods. The study has been performed on 50 children from the Pediatric Unit. Each patient voided a pre-test urine sample and ingested a solution containing 5 g of lactulose and 1 g of mannitol in 120 ml of deionised water. Urine was collected during the next 6 h and the total volume was measured. 10-ml aliquot for each sample was stored at -20 °C until analysis. The chromatographic separation was accomplished by using an NH₂-column, the detection with a Q-Trap 2000 system.

Results. Multiple calibration curve exhibited consistent linearity and reproducibility. Linear responses were observed in the concentration range 0-400 µg/ml for both mannitol and lactulose. Limits of detection were 12.5 mg/l for lactulose and 1.25 mg/l for mannitol with a signal-to-noise ratio of 10. The mean L/M ratio in healthy controls was calculated to be 0.024 (range 0.018-0.030). The comparison of the L/M ratio between groups with and without ARP gave a significant difference (0.12 vs. 0.02, p<0.05).

Conclusions. The comparison of L/M values of healthy children with those found in children affected by idiopathic ARP demonstrates that in the latter subjects an alteration of intestinal permeability occurs. The method can represent a useful tool to monitor the intestinal functionality in children with ARP conditions and help for an accurate patient discrimination for diet restrictions.

238

SCREENING DEL CARCINOMA COLON-RETTALE NELL'A.S.L. DELLA PROVINCIA DI LODI

A. Anesi¹, C. Fontanella¹, L. Cerutti¹, C. Brera¹, P. Votta², C. Galli³, C. Sabbia⁴, G. Marazza⁵, F. Pavesi¹

¹Lab. Analisi, Osp. Maggiore, Lodi

²Gastroenterologia, Osp. Maggiore, Lodi

³Anatomia Patologica, Osp. Maggiore, Lodi

⁴Radiologia, Osp. Maggiore, Lodi

⁵Ufficio Vigilanza Igiene Pubblica A.S.L. di Lodi

Nell'A.S.L. della Provincia di Lodi è in atto dal dicembre 2005 lo screening del carcinoma colon-rettale secondo le indicazioni regionali (delibera Regione Lombardia N. VII/20889 del 16/02/2005).

Metodologia. E' condotto in soggetti asintomatici, di età compresa tra 50-69 anni, di entrambi i sessi selezionati dagli elenchi dell'Anagrafe Assistiti, mediante determinazione immunochimica quantitativa dell'emoglobina fecale (FOBT) (OC-Sensor, Alfa Wassermann) seguita da colonoscopia totale per i pazienti risultati positivi (soglia 100 ng/mL).

Risultati. Nel primo round (fino ad aprile 2008), hanno aderito all'invito 18.426 abitanti su 53.391 inviti spediti. La partecipazione media osservata nei 62 comuni è stata del 34,25% (52,61% femmine vs. 47,39% maschi).

La percentuale media di positività del FOBT è pari al 6,4% (1175 casi); aumenta con l'età sia nei maschi (range da 3,2% a 11,8%) che nelle femmine (range da 4,2% a 6,6%); nei maschi è superiore a quelle delle femmine in tutte le fasce di età.

L'adesione agli approfondimenti colonscopici è stata complessivamente del 62,1% (68,1% nei maschi vs. 57,8% nelle femmine), dato inferiore a quello nazionale pari al 78%. 445 soggetti non hanno eseguito approfondimenti o li hanno fatti in A.S.L. diverse.

Istologicamente si sono riscontrati: 66 carcinomi; 156 adenomi ad alto rischio; 264 adenomi a basso rischio. I tassi di identificazione (Detection Rates x 1000) per lesioni istologicamente confermate sono risultati: 3,6 per cancro; 8,5 per adenomi ad alto rischio; 14,3 per adenomi a basso rischio. I tassi diagnostici per cancro ed adenoma avanzato, aumentano con l'aumentare dell'età e sono più alti nei maschi. Il Valore Predittivo Positivo dell'esame di screening è pari al 9,3% per cancro; al 22% per adenoma ad alto rischio; al 37,2% per adenoma a basso rischio.

La distribuzione per stadio dei 66 carcinomi screen-detectati nel periodo di studio è la seguente: TIS: 11; Stadio I: 9; Stadio II: 6; Stadio III: 10; Stadio IV: 0; Non stadiato: 30. **Conclusioni.** Complessivamente i dati evidenziano una buona performance del test di screening. I tassi di identificazione diagnostica e i VPP per cancro ed adenomi, in particolare, confermano la capacità dell'esame di screening di selezionare tra gli adenomi quelli a potenziale maggior rischio.

239

PTX3 PROTEIN DETERMINATION IN NEONATAL AND IN CHILDHOOD AGE

A. Galli¹, M. Nuccetelli¹, A. Di Paolo², R. Tambucci², R. Pierini¹, S. Bernardini¹, G. Federici¹

¹Department of Internal Medicine, University of Rome "Tor Vergata"

²Department of Neonatology Sant'Eugenio Hospital, University of Rome "Tor Vergata"

The pentraxins are acute phase proteins which may be divided in two structural classes: "short" and "long" pentraxins.

C-reactive protein (CRP) and serum amyloid P-component (SAP) are classic "short" pentraxins produced in the liver and regulated especially by IL-6.

PTX3 is the prototype of "long" pentraxins. It was recently found that PTX3 is stored in specific neutrophils granules and undergoes release in response to microbial recognition and inflammatory signals. Thus, neutrophils are a reservoir, ready for rapid release of PTX3 and given their abundance in the circulation, these cells represent a major source of PTX3 in the early phases of inflammation. During the next phases of inflammation PTX3 is synthesized by innate immunity cells and vascular cells (1).

Measurement of CRP is routinely used for diagnosis and monitoring of inflammatory and infectious diseases. Evidence suggests that PTX3 could be a useful new serological marker, rapidly reflecting tissue inflammation and damage under several clinical conditions. In fact, blood levels of PTX3, low in normal conditions (about 2 ng/ml in man), increase rapidly (peaking at 6-8 h after induction) and dramatically (200-800 ng/ml), correlating with the severity of disease.

The normal upper limit of plasma PTX3 level was determined only in adult patients. No data are available about children, infants and newborns.

The aim of this study was to evaluate normal plasma PTX3 level in neonatal and in childhood age.

The PTX3 values were determined on 140 patients by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using a monoclonal antibody (Mab-PTX3, Alexis Biochemicals).

According to literature, we found a low PTX3 physiological level in adults (1.5 ng/ml) while there is a progressive increase of normal PTX3 values with age: children (4.28 ng/ml), infants (6.07 ng/ml) and newborns (11.69 ng/ml).

Reference

1. Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, et al. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 2006;18:10-5.

240

RISPOSTA ALLO STRESS CHIRURGICO IN OFTALMOLOGIA PEDIATRICA: DUE TECNICHE ANESTESIOLOGICHE A CONFRONTO

C. Rossi¹, M. Sammartino², N. Continolo², P. De Sole¹

¹Ist. di Chimica e Biochimica Clinica, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Ist. di Anestesiologia e Rianimazione, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Obiettivi. E' ben noto che qualsiasi stimolo stressogeno determina un'alterazione della normale omeostasi dell'organismo. Anche interventi chirurgici minori inducono importanti modificazioni della risposta neuroendocrina, metabolica e immunitaria. Nel nostro studio abbiamo analizzato, mediante l'utilizzo di marcatori biochimici, l'effetto di due diverse tecniche anestesiologiche sulla risposta allo stress chirurgico.

Materiali e metodi. Lo studio è stato eseguito su 19 bambini operati in chirurgia oftalmica: 9 bambini in anestesia TIVA (Propofol/Remifentanil-P/R) e 10 bambini in anestesia con Desflurane/Remifentanil (D/R). Per la valutazione dello stress chirurgico sono stati presi in esame i valori di: ACTH, Cortisolo, Prolattina, Insulina, Lattato e Glucosio, prelevati al tempo base (T0) e a fine intervento (T8). I dosaggi sono stati effettuati: Glucosio e Lattato su Olympus 2700, ACTH su analizzatore Immulite 2000 e Prolattina, Cortisolo ed Insulina su analizzatori Modular E170.

Risultati. I risultati ottenuti indicano, accanto ad un marcato aumento della prolattina presente in ambedue le anestesi, un aumento, anche se moderato dell'insulinemia (6/9 casi) con diminuzione della glicemia (6/9), del lattato (6/9) e del cortisolo (6/9) nell'anestesia con TIVA mentre in quella con Desflurane le variazioni non sono così univoche. L'ACTH, inoltre non ha subito variazioni in ambedue le anestesi.

Discussione. Per quanto riguarda la risposta allo stress chirurgico, l'anestesia D/R sembra indurre solo una variazione non statisticamente significativa degli indici di riferimento, mentre la TIVA sembra causare delle modificazioni metabolico-ormonali più significative. In conclusione questo particolare tipo di anestesia bilanciata (endovenosa/inalatoria) può essere ritenuta una tecnica altrettanto valida quanto l'anestesia totalmente endovenosa e particolarmente adeguata in oftalmologia pediatrica.

Bibliografia

Castejon-Casado J et al. Hormonal response to surgical stress in schoolchildren, *Eur J Pediatr Surg*, 2001 Feb;11(1):44-7

241

SEMILOGIA ANALITICA DELLE INFEZIONI DELLE VIE URINARIE (IVU) ATTRAVERSO IL FLUSSO LOGICO ANALITICO MICROBIOLOGICO (FLAM): UN NUOVO MODELLO DI STUDIO

T. Suppa¹, G. Lobreglio¹, P. Colazzo¹, D. Turco¹, L. Leo¹

¹U.O. Medicina di Laboratorio, A.O. "Cardinale G. Panico", Tricase (LE)

Background e scopo del lavoro. E' ormai consuetudine, in molti laboratori clinici, l'uso dell'esame chimico-fisico e microscopico delle urine come strumento di screening preventivo di batteriuria e quindi di IVU.

Un campione clinicamente significativo per IVU, all'esame microscopico del sedimento urinario, è caratterizzato sia da batteriuria, ma anche da leucocituria, piuria o aggregati leucocitari e elementi cellulari provenienti dall'epitelio non squamoso (NSE).

Nel nostro studio infatti, utilizzando un analizzatore per immagini di sedimenti urinari (sistema analitico IRIS IQ200), abbiamo strutturato un processo decisionale logico attraverso il FLAM cercando di dimostrare la presenza di una correlazione semiologia tra leucocituria, piuria, batteriuria e elementi cellulari e introducendo il concetto di campione clinicamente significativo da inviare o meno a esame microbiologico per sospetta IVU.

Materiali e metodi. Sono stati valutati i risultati di campioni di urine provenienti da 750 pazienti. Tutti i campioni sono stati analizzati con lo strumento AutionMax AX-4280 (Menarini, Firenze) per l'esame chimico-fisico e sullo strumento IRIS IQ200 (IL, Milano) per l'esame del sedimento. I campioni sono stati sottoposti a semina su piastra con ansa da 1µL, utilizzando terreno differenziale cromogeno (URI-4). Sono stati considerati positivi all'esame batteriologico i campioni con $cb\#100.000$ ufc/ml.

Risultati. Dall'analisi di 750 campioni si sono ottenuti i seguenti risultati: sensibilità=0,70; specificità=0,98; VPN=0,96; VPP=0,88; accuratezza diagnostica=0,95.

Conclusioni: Dai dati ottenuti è emerso che i FLAM permettono una analisi sistemica dei segni clinici anamnestici in rapporto con la malattia (IVU). Su un totale di 750 campioni, 658 (88%) sono risultati concordanti negativi; 59 (8%) sono risultati concordanti positivi; 8 (1%) sono risultati FP e 25 (3%) sono risultati FN.

Quindi, possiamo affermare che lo screening delle IVU tramite i FLAM avrebbe fatto risparmiare la semina su piastra di ben 658 campioni, determinando l'accorciamento dei tempi di risposta, la riduzione del carico di lavoro, oltre ad un abbattimento dei costi relativi al materiale.

Bibliografia

Accordino A, Conti A, Gasparini L, Dalmazzo A. Microscopia automatizzata e screening delle batteriurie.

242

D-DIMERO METODICHE A CONFRONTO

F. Antonelli¹, L. Villani¹, L. Masotti²

¹U.O. Lab. Analisi Chimico Cliniche, Osp. Cecina Az. USL 6 LI

²U.O. Medicina Interna, Osp. Cecina, Az. USL 6 LI

Introduzione. Il principale ruolo del D-Dimero nella pratica clinica è rappresentato dalla sua applicazione nella diagnostica della malattia tromboembolica venosa. Un D-D negativo associato ad una bassa probabilità clinica pre-test valutata mediante scores a punteggio ha un alto potere predittivo negativo nell'escludere la diagnosi.

Scopo. Esistono differenti metodiche di dosaggio che hanno diversa sensibilità, specificità e potere predittivo negativo oltre a costi per test elevati. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare una metodica BIOSIDE a confronto con una metodica ritenuta di riferimento Biomerieux.

Sono stati testati pazienti pervenuti al Ps con sospetta EP, i sistemi utilizzati sono: D-Dimer Biomerieux su strumento Vidas campione in citrato e Triage D-dimer Bioside e campione in EDTA

Materiali metodi. D Dimer Exclusion test immunoenzimatico a fluorescenza su strumento Vidas Biomerieux. tempo d'esecuzione 45 campione plasma Na citrato.

D-DimerTest immunodosaggio a fluorescenza su strumento Triage Bioside, tempo d'esecuzione 15 min, campione plasma Edta.1

In ambedue i test, la concentrazione dell'analita è proporzionale all'intensità di fluorescenza rilevata.

Sono stati analizzati i campioni di 40 pz del prs con sospetta diagnosi d'Ep.

Sono stati esclusi campioni codi pz con trombosi venosa profonda.

Risultati. Il metodo in esame ha dimostrato una buona linearità statistica rispetto al metodo di riferimento, con un valore di correlazione di 0.88 un r 0.970 Intercetta -85.256

Conclusioni. La valutazione dei risultati ottenuti tra metodi permette confermare le performance positive del test Bioside, non solo per la qualità del risultato ma anche per i tempi d'esecuzione confermati in 15', e dalla facilità d'utilizzo dello strumento di lettura.

Bibliografia

Thromb Haemost 1996 Contribute of new rapid individual and automated D Dimer Elisa. De Moerloose et al.

Laancet 1997 Wells. Value of assenssment of pre-testprobability of deep vein thrombosis in clinical management.

243

HBA1C: METODI A CONFRONTO

F. Antonelli¹, P. Brunori², L. Villani¹, F. Bonini², L. Masotti³

¹U.O. Lab. Analisi Chimico Cliniche, Osp. Cecina, Az. USL 6 LI

²U.O. Lab. Analisi Chimico Cliniche, Osp. Piombino, Az. USL 6 LI

³U.O. Medicina Interna, Osp. Cecina, Az. USL 6 LI

La determinazione dell'emoglobina glicosilata (A1C) è un parametro importante per la valutazione retrospettiva del controllo glicemico in pazienti con Diabete mellito.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare una metodica immunoturbidimetrica, rispetto a quella di riferimento utilizzata nei laboratori della nostra Azienda USL; Cromatografia HPLC Menarini.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati 180 campioni di pazienti provenienti sia dai reparti di degenza sia dall'ambulatorio di Diabetologia nonché pz esterni ambulatoriali.

I campioni raccolti in provette con Edta K3 e processati con la strumentazione hplc Menarini e con metodo Roche applicata a Hitachi 917, quest'ultimo prevede una prediluizione in soluzione emolizzante, quindi il dosaggio della A1c con anticorpo antiA1C e lettura turbidimetrica della reazione.

Per ambedue i metodi il calcolo veniva effettuato secondo lo standard DCCT/NGSP con valori di riferimento di 4.8-5.9% di HbA1C

Analisi dei risultati. Il metodo in esame ha dimostrato una buona linearità statistica rispetto al metodo di riferimento, con un valore di intercetta Y 0.060 e un $r = 0.989$ con una sottostima che nelle varie sedute analitiche eseguite è sempre stata costante e che corretta con fattore K medio permette di avere risultati sovrapponibili a quelli ottenuti con metodica di riferimento.

Durante questo studio sono stati eseguiti controlli in sedute analitiche diverse per verificare la costanza del fattore.

Durante le sedute analitiche sono state verificate la precisione del metodo intraserie utilizzando controlli a valori noti ripetuti fino a 20 volte ottenendo un CV 1.9%, e un Cv 2.2% per interserie.

L'accuratezza del metodo è stata valutata utilizzando controlli a valore noto ripetuti fino a 25 volte ciascuno ottenendo per il 1° controllo (val 10.4) un Cv 2.2%, per il 2° controllo (val 6.81) un Cv 1.32%. Al fine di controllare la linearità tra i metodi, con frequenza bisettimanale un campione è inviato al laboratorio in possesso del sistema in cromatografia (Menarini) e testato, per verificare la costanza del fattore di correzione per mantenere i dati allineati.

Conclusioni. È evidente la buona affidabilità del metodo utilizzato, correlato con l'ausilio di un fattore al metodo di riferimento.

244

OMOCISTEINE: METODOLOGIE A CONFRONTO

L. Bassi¹, O. Paoletti¹, A. Alatri¹, A. Cogrossi¹, E. Spotti¹, M. Stramezzi¹, A.M. Sorgente¹, L. Comelini², A. Sarzi Amade², M.G. Barbarini², S. Rizzardi², S. Testa¹

¹Azienda Istituti Ospitalieri, Lab. Anal. Chim. Clin. e Microbiol, Centro Emostasi e Trombosi, Cremona

²Azienda Istituti Ospitalieri, Lab. Anal. Chim. Clin. e Microbiol, Cremona

Introduzione. Studi epidemiologici indicano che l'iperomocisteinemia correla con un maggiore rischio trombotico arterioso e venoso. Lo sviluppo di differenti metodologie di dosaggio ha portato alla necessità di verificare l'affidabilità dei sistemi in uso nel nostro laboratorio, confrontando la variabilità dei risultati.

Materiali e Metodi. Sono stati valutati i seguenti sistemi analitici automatici:

1. Olympus AU2700 (Olympus Italia srl): test enzimatico, campioni in eparina (non è possibile l'uso di EDTA)
2. Immulite 2000 (Siemens): test immunochimico/chemiluminescenza, campioni in eparina ed EDTA

I sistemi sono stati confrontati con il sistema Axsym(Abbott) in uso in laboratorio: test immunologico in fluorescenza con luce polarizzata, campioni in EDTA.

I metodi statistici utilizzati sono stati media, mediana, correlazione, Bland e Altman e regressione Passing Bablock. Risultati. Sono stati testati 90 campioni, centrifugati subito all'arrivo in laboratorio, conservati in ghiaccio se prelevati in EDTA, senza ghiaccio se in eparina.

Tab.1 (Strumento, Media, SD, Mediana)

Axsym - 14.48; 8.5; 12.25

Olympus - 17.16; 7.2; 15.89

ImmulateEDTA - 12.19; 5.8; 12.50

Immulate/eparina - 13.55; 5.6; 12.40

Tab.2 Correlazioni

Axsym/Immulate EDTA 0.9803

Axsym/Olympus 0.9935

Axsym/Immulate eparina 0.9719

ImmulateEDTA/Immulate eparina 0.9704

Olympus/Immulate eparina 0.9645

I livelli di concordanza sono stati misurati con la statistica di Bland e Altman considerando come riferimento il sistema Axsym.

Valutando i range di riferimento dichiarati per i diversi metodi sono state calcolate le% di patologici: Immulite (VN>12, patologici 50%), Olympus (VN>15, patologici 53%), Axsym (VN>15 uomini, patologici 30%, VN>12 donne, patologici 7%).

Conclusioni. La valutazione ha evidenziato come i diversi sistemi siano ben correlati tra loro. Si osserva una maggiore percentuale di positività di Olympus ed Immulite rispetto ad Axsym; questo può determinare l'ipertrattamento dei pazienti con valori patologici. Il metodo Olympus si presenta come una valida alternativa al metodo Axsym permettendo l'uso della provetta con eparina, largamente utilizzata per la diagnostica in biochimica clinica, con conseguente riduzione della quantità di sangue prelevato al paziente. È indispensabile ridefinire i range di normalità per sesso in rapporto al metodologia in uso.

245

PERFORMANCE EVALUATION ELECSYS ANTI HCV (MODULAR ANALYTICS E170)P. De Leo¹, A. Burighel¹, M. Giannuzzi², F. Alborino¹¹*Servizio di Medicina di Laboratorio, ULSS 13, Dolo-Mirano, Venice, Italy*²*Roche Diagnostics, Monza, Italy*

Aim. The aim of the study was to evaluate a new third generation Roche reagent, "Elecsys anti_HCV Modular Analytics E 170", for the qualitative determination of antibodies to C virus (HCV) in human serum or plasma, especially regarding precision, sensitivity and specificity performances (1).

Patient and Methods. Intra-assay imprecision was calculated through 21 replicates on three pools (negative, low positive and positive).

For sensitivity and specificity evaluation, we analyzed 1045 fresh human sera from in and out-patients using the left-over from the routine HCV method (Ortho Clinical Diagnostics Vitros ECI anti HCV).

The Ortho reagent specificity was 99.7%, and its sensitivity 100%, determined over 435 positive samples (data from the package insert).

Samples with borderline or positive results were re-assayed with both methods and Immunoblot confirmation was performed with Biorad Deciscan HCV PLUS and RIBA Ortho Clinical Diagnostics tests. Finally, the "indeterminate" samples were further analyzed with HCV RNA PCR by Roche.

All data were managed in a strictly anonymous manner, in compliance with the Privacy Act (L. 675/1996).

Results. The results confirmed a 98.81% specificity (compared to 98.52% of the reagent currently in use) and a 100% sensitivity for Elecsys anti HCV.

The intra-assay CVs, calculated on the three pools, were 4.2, 7.2 and 6.6, respectively.

Conclusions. The addition of this new test in the Modular profile allows serological reagents range fulfilment, extending tests consolidation in the system.

Reference

1. Vernelen K et al. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *The Lancet* 1994;343(8901):853.

246

IL DOSAGGIO DEL TSH IN IMMUNOFLUORESCENZA E CHEMILUMINESCENZA: NOSTRA ESPERIENZAA. Carucci¹, S. Tundo¹, A. Legrottaglie¹, A. Ostuni¹, R.Lovero¹, C. Curigliano¹, A. Olivi¹, A. Matarrese¹, M.Pepe¹, E. Vinci¹¹*U.O.C. Laboratorio di Analisi di Chimica Clinica, Fasano Ostuni Cisternino (BR)*

Introduzione. Il TSH è una glicoproteina con peso molecolare pari a 28.000 da, sintetizzata dalle cellule basofile dell'ipofisi anteriore. Un'alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide può causare una produzione eccessiva di ormoni tiroidei (ipertiroidismo) con una riduzione fino alla non rilevabilità dei valori di TSH. Mentre una sensibile riduzione o insufficiente produzione degli ormoni tiroidei con un eccesso di TSH comporta un quadro clinico di ipotiroidismo.

Scopo del lavoro. E' stato quello di valutare due analizzatori che utilizzano metodiche differenti per il dosaggio del TSH. Sono stati utilizzati: AIA 21 (Tosoch) con metodologia immunofluorescenza ed Architect (Abbot) in chemiluminescenza

Materiali e metodi. Per la valutazione degli analizzatori è stato realizzato un pool di sieri di pazienti asintomatici per storia di patologia tiroidea e con valori di TSH nei limiti. Sono stati selezionati 40 sieri di pazienti con ipertiroidismo e 40 con ipotiroidismo. Tutti i campioni sono stati analizzati contemporaneamente su entrambi gli strumenti. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati: la media, il CV, test t per il confronto di medie, la correlazione e la retta di regressione.

Risultati. I valori di TSH ottenuti analizzando il pool di sieri sull'Architect sono: Media 1.56, CV intra serie 2.1, tra serie 2.8. l'analizzatore AIA ha fornito i seguenti risultati: media 1,82 cv intra serie 3.20 tra serie 3.72. il T-test è di 0.669 con $p > 0.05$, il coefficiente di correlazione è di 0.96, $R = 1,146$. Per i campioni ipotiroidici i valori sono: media 0.21 per l'Architect e 0.25 per l'AIA, il T-test 0.12 con $p > 0.05$ ed il coefficiente di correlazione è di 0.95 $R = 1.11$. Per i campioni ipertiroidici i valori sono: media 7.21 per l'Architect e 8.89 per l'AIA, il T-test 0.75 con $p > 0.05$ ed il coefficiente di correlazione è di 0.95 $R = 1.22$.

Conclusioni. Il dosaggio del TSH come riportato nella Letteratura è indispensabile al clinico per discriminare le differenti patologie tiroidee. La netta correlazione tra gli strumenti presi in esame consentono un uso indifferente, anche se l'Architect ha mostrato una maggiore sensibilità ed un migliore CV sia per valori bassi che alti di TSH. Inoltre lo stesso è in grado di ridurre i tempi di refertazione.

247

CAPILLARYS ERYTHROCYTE SEDIMENTATION RATE (ESR) IN ONCOLOGICAL PATIENTS: LOW HAEMATOCRIT PITFALLS AND SAMPLE COLLECTION OPTIMIZATION IN A CERTIFIED QUALITY SYSTEM LABORATORY

B. Frollano¹, G. Cigliana¹, G. Vitelli¹, R. Fontinovo¹, S. Giommi¹, I. Cordone¹

¹Clinical Pathology, Regina Elena Cancer Institute, IFO, Rome, Italy

Introduction. In oncological patients haematocrit values (HCT) are frequently out of normal ranges, so ESR performed by automated systems that utilise the infrared light, like VesMatic, is often overvalued in consequence of low HCT interferences. Furthermore, using a plastic tube, the lost of vacuum is observed in a significant proportion of samples, leading to a not-conformity (NC) report according to the procedure of a certified quality system laboratory. Aim of the study is to compare the capillary method of the Test1 vs. the standard Westergren and the VesMatic in a significant proportion of oncological patients with low HCT values and to evaluate the incidence of NC due to the lost of vacuum in the two type of samples collecting tubes. Methods. A number of 170 oncological patients were selected and analyzed by Westergren reference method with WG graduated capillary in EDTA Vacu-tec vials, VesMatic (Diesse) in Sodium Citrate Ves-tec vials and Test1 (Alifax) in EDTA Vacu-tec vials. The HCT value was determined by STKS analyser (IL).

Results. A different correlation was documented between the WG reference method compared to the Test1 (R = 0.99) and the Diesse (R = 0.79) respectively. Moreover the NC due to the lost of vacuum according to the Diesse method was 5,26% out of 24000 samples, received in the laboratory from January 2006 to December 2007. No NC due to the collecting method was documented when the EDTA vacuum glass tube was utilised. Conclusions: the Test1 produced reliable ESR results, especially in the cases of HCT pathological values, showing to be more useful than VesMatic for a diagnostic use in oncopathology and a good correlation with the Westergren standard method. Using Test1 we expect that NC-ESR samples for 2008-2009 period could be importantly reduced, so to have a good optimization of the resources inside a laboratory's contest.

248

VALUTAZIONE DI sediMAX, UN NUOVO ANALIZZATORE AUTOMATICO DEI SEDIMENTI URINARI

G. Garigali¹, G. Bayer², M.D. Croci¹, T. Kranicz², S. Raimondi³, G.B. Fogazzi¹

¹Laboratorio di ricerca sulle urine, U.O. di Nefrologia, Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

²Elektronika 77, Budapest, Ungheria

³Divisione di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

Scopi. Valutazione delle prestazioni del nuovo analizzatore automatico di sedimenti urinari (SU) sediMAX (A. Menarini Diagnostics, produttore Elektronika 77). sediMAX analizza i SU mediante una videocamera che per ogni campione realizza 15 fotogrammi corrispondenti ad altrettanti campi microscopici ad un ingrandimento di ~250x. Le immagini sono poi valutate da un software basato su una rete neurale in grado di riconoscere: eritrociti (GR), leucociti (GB), cellule squamose (CS), cellule epiteliali non squamose (CENS)(= cellule tubulari e transizionali), cilindri ialini (C-IAL), cilindri patologici (C-PAT), miceti, batteri, cristalli di calcio ossalato (Ca-OX) mono- e bi-idrato, triplo fosfato, acido urico, e muco. I risultati vengono espressi sia in modo quantitativo (es. n°/µL) che come immagini. Materiali e metodi. Analisi di tutti i SU pervenuti al nostro laboratorio tra il 12 marzo e il 30 novembre 2007 senza alcuna selezione mediante microscopia manuale (MM) e sediMAX.

Confronto dei risultati ottenuti mediante MM e sediMax per 7 elementi e valutazione statistica di: 1. sensibilità (SENS), specificità (SPEC), valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN); 2. livello di accordo tra MM e sediMax per 4 diverse classi quantitative; 3. accuratezza (mediante curve ROC).

Risultati. Sono stati confrontati 1238 SU (187 normali; 1051 patologici) ottenuti da 781 soggetti. Solo 5 SU (0.4%) sono stati esclusi da sediMAX in quanto superiori alle sue capacità di analisi.

1.

GR	GB	CS	CENS	C- IAL	C- PAT	Ca-OX	
SENS (%)	87	92	85	89	91	76	79
SPEC (%)	76	76	80	52	51	47	85
VPP (%)	79	64	68	18	67	53	18
VPN (%)	83	95	93	98	69	69	99

2. Livello di accordo tra MM e sediMAX.

GR, GB e CS: elevato; C- IAL, C- PAT e Ca-OX: buono; CNS: basso.

3. Accuratezza.

GR e GB: elevata; CS, CNS, Ca-Ox: moderata; C-PAT: bassa.

Conclusioni. Il nostro studio dimostra che sediMAX è in grado di riconoscere in modo soddisfacente GR, GB, CS e Ca-OX; in modo accettabile, C-IAL, C-PAT e CNS. Gli studi di riproducibilità e linearità sono in corso.

249

DETERMINAZIONE DEL COLESTEROLO LDL ED sd-LDL SU AU600 OLYMPUS

A. Latte¹, G. Cangiano¹, M. Russo¹, F. Forte¹, E. Di Maina¹, A. Garofalo¹, M. D'Amora², A. Risitano¹

¹Lab. Patologia Clinica, Osp. dei Pellegrini, ASL NA 1

²Lab. Patologia Clinica, Osp. degli Incurabili, ASL NA 1

La malattia cardiovascolare comprende diverse patologie che interessano cuore e vasi sanguigni e pertanto possono essere responsabili di varie forme di invalidità o di morte. La riduzione della concentrazione ematica di colesterolo rappresenta uno degli obiettivi principali volti alla contrazione del rischio cardiovascolare.

Il nostro lavoro ha come duplice obiettivo: da un lato la valutazione di alcuni parametri biochimici quali colesterolo LDL, sd-LDL, omocisteina (HCY) e peptide natriuretico (Pro-BNP) dosati su 51 pazienti ipercolesterolemici ricoverati presso l'U.O. di Cardiologia del P.O. dei Pellegrini ASL NA 1; dall'altro adattare una metodica di colesterolo LDL sull'analizzatore biochimico AU600 Olympus.

Le metodiche della ditta Sentinel per colesterolo LDL ed sd-LDL, utilizzano detergenti ed enzimi specifici in grado di misurare un complesso colorato letto alla lunghezza d'onda di 600 nm.

Ambedue i reagenti sono facilmente adattabili sullo strumento sopra citato e molto simili per composizione, differiscono solo per il volume di campione e per la filtrazione preliminare richiesta nel dosaggio di colesterolo sd-LDL. La determinazione del colesterolo LDL mostra una linearità del metodo che raggiunge i 400 mg/dL.

Nell'intervallo tra 10 e 400 mg/dL di colesterolo-LDL si evidenzia un profilo di imprecisione con CV < 3%. Il livello minimo rilevabile sull'analizzatore è di 5,2 mg/dL. La precisione nella e tra le serie, mostra un CV% < 3%. Buona è la correlazione ottenuta confrontando campioni di siero dosati con i metodi Sentinel (y) e Roche (x) ($r = 0,9795$; $y = 0,9866 \cdot x + 6,9653$).

Una valutazione preliminare (da confermare in seguito con una maggiore casistica) indica che il dosaggio dell'HCY è risultato positivo per oltre l'80% dei pazienti testati mentre la positività al pro-BNP era inferiore al 16% e certamente non correlata alla patologia metabolica del colesterolo.

Più significativi appaiono invece gli aumenti di sd-LDL in pazienti che presentano una colesterolemia LDL superiore o uguale a 160 mg/dl.

Bibliografia

Hirano T et al. Clinical significance of small, dense low-density lipoprotein cholesterol levels determined by the simple precipitation method. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2004;24:558.

250

SCREENING DEL CARCINOMA COLON-RETTO MEDIANTE DETERMINAZIONE IMMUNOCHEMICA QUANTITATIVA DELL'EMOGLOBINA FECALE: ESPERIENZA DEL LABORATORIO MEDICO DELLA ASL DI VARESE

P. Luraschi¹, S. Salerno², D. Greco¹, M.A. Ulissi¹

¹Laboratorio Medico, Dipartimento di Prevenzione Medico, ASL, Varese

²Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi dell'Insubria, Varese

In Italia il carcinoma del colon-retto ha una incidenza di 35-40.000 nuovi casi/anno e 18.000 decessi/anno. I programmi di screening attuati hanno consentito una diagnosi precoce con conseguente diminuzione del numero dei decessi. L'ASL di Varese ha attivato nel 2006 un programma di screening sulla popolazione residente (50/69 anni) che prevede la ricerca, con cadenza biennale, dell'emoglobina (Hb) fecale in un unico campione. In caso di positività (valore soglia: 100 ng/mL), i soggetti sono invitati a sottoporsi ad accertamenti di secondo livello. La misurazione immunochimica automatizzata della Hb fecale era eseguita inizialmente con strumento "OC Sensor μ " e con strumento "OC Sensor Diana" in seguito, entrambi prodotti da Eiken Chemical e commercializzati da Alfa Wassermann. Per il nuovo strumento sono state valutate linearità, esattezza analitica e imprecisione entro la serie, impiegando diluizioni seriali di una soluzione di Hb di concentrazione nota nel tampone per la raccolta e conservazione del campione, e imprecisione tra le serie, analizzando 2 materiali di controllo a 2 livelli di concentrazione. Il metodo ha mostrato linearità e ottimo accordo trovato/atteso (regressione trovato/atteso: pendenza 1.02; intercetta 2.15; $r = 0.999$) nell'intervallo di concentrazioni 40-1300ng/mL. L'imprecisione entro la serie, come CV%, è risultata compresa tra 0.5% e 2.5% per concentrazione di Hb rispettivamente di 132 e 1298 ng/mL: a 100 ng/mL il CV misurato è 1.2%. L'imprecisione tra le serie, come CV% dell'analisi di 2 materiali di controllo a due livelli di concentrazione, è risultata 6.3% e 2.1% per concentrazione di Hb rispettivamente di 90 e 155 ng/mL. I risultati dello screening si riferiscono a circa 240.000 soggetti invitati, dei quali il 36% ha aderito all'invito: di questi il 5.4% ha ottenuto esito positivo. L'80% circa dei soggetti con esito positivo ha aderito agli accertamenti di secondo livello, con una percentuale di positività per neoplasia maligna pari al 6.6% (in linea con i risultati regionali e nazionali, rispettivamente 7.3 e 6.8%), e per adenomi pari al 40%. Si può concludere che lo strumento utilizzato per il programma di screening offre prestazioni adeguate per linearità, precisione ed esattezza analitica. Maggiori dati sulla efficacia medica dello screening saranno comunicati in seguito.

251

**DETERMINAZIONE DELLA CICLOSPORINA:
CONFRONTO TRA IL METODO FPIA vs IL METODO
CEDIA**

S. Mazzolini¹, A. Colatutto¹, L. De Luca¹, B. Marcon¹, L. Isola¹, R. Zaglia¹, A. Daminato¹, N. Pradal¹, A. Lerussi¹, G. Barbina¹, P. Sala¹

¹Laboratorio Analisi Elezione, Az. Osp. Univ. S. Maria della Misericordia, Udine

Scopo del lavoro. Lo scopo dello studio è quello di confrontare due metodi per il dosaggio della ciclosporina: la metodica CEDIA di recente introduzione e caratterizzata da una fase pre analitica molto semplice vs la metodica FPIA di comune utilizzo nella pratica routinaria.

Materiali e metodi. 97 campioni di sangue intero in EDTA di pazienti in terapia cronica anti-rigetto con ciclosporina pervenuti al laboratorio di Elezione sono stati dosati in un primo tempo con strumentazione utilizzando il metodo FPIA (Tdx-Flx Abbott), in seguito gli stessi campioni sono stati processati con metodica CEDIA PLUS (Microgenics) su strumento Ilab 650.

Risultati. Dall'esame dei dati in nostro possesso si evince una ottima correlazione tra il metodo FPIA ed il metodo CEDIA che è confermata dalla retta di regressione derivante dall'analisi dei campioni (R^2 0,89). La maggior parte dei valori è compresa all'interno delle due deviazioni standard ed il coefficiente che deriva dalla curva di Bland-Altman corrisponde a 0,023.

Discussione e conclusioni. L'utilizzo sempre più esteso del monitoraggio farmacologico del trapianto e l'uso estensivo della terapia immunosoppressiva rendono necessari dei metodi semplici, affidabili e rapidi per il laboratorio. Nonostante il numero limitato di campioni processati in questo studio, il metodo CEDIA (Microgenics su Ilab 650) ha dimostrato degli indubbi vantaggi rispetto al metodo FPIA: in primo luogo non è necessario il pretrattamento del campione con soluzione precipitante e solubilizzante, inoltre vi è una facile adattabilità strumentale ad elevati carichi di lavoro con conseguente risparmio di tempo e risorse.

Il successo della terapia trapiantologica ha reso una evenienza comune e routinaria l'utilizzo di farmaci immunosoppressivi e il necessario monitoraggio, in quest'ottica rivestono particolare importanza caratteristiche strumentali quali l'affidabilità, la sensibilità, la specificità e la semplicità del trattamento del campione.

Bibliografia

Dumont RJ, Ensom MH. Methods for clinical monitoring of cyclosporin in transplant patients. Clin Pharmacokinet 2000;38:427-47.

252

**DETERMINAZIONE DELL'ALCOLEMIA CON
FINALITÀ MEDICO LEGALE: CONFRONTO TRA
IL METODO ENZIMATICO E LA METODICA GAS
CROMATOGRAFICA**

S. Mazzolini¹, A. Colatutto¹, B. Marcon¹, L. Isola¹, R. Zaglia¹, N. Pradal¹, L. De Luca¹, Lerussi¹, R. Iob¹, G. Barbina¹, A. Daminato¹, P. Sala¹

¹Laboratorio Analisi Elezione, Az. Osp. Univ. S. Maria della Misericordia, Udine

Scopo del lavoro. E' stato quello di confrontare un metodo enzimatico vs il metodo di riferimento gas cromatografico per l'analisi dell'alcolemia, per valutare la linearità dei metodi e la confrontabilità dei dati ottenuti con le due metodiche.

Materiali e Metodi. Presso l'Istituto di Analisi di Elezione dell'Ospedale di Udine sono stati processati 150 campioni per la determinazione dell'alcolemia. Tutti i campioni sono stati prelevati, previo consenso informato del paziente, in siringa eparinata, sottoposti a catena di custodia, e sono stati analizzati entro mezz'ora dall'arrivo con metodica enzimatica su strumentazione SYNCHRON LX20-Beckman, con metodo cinetico-enzimatico. (sensibilità è 4mg/dL, range 5-600 mg/dL). Lo stesso campione, refrigerato, è stato processato con metodica gascromatografica in spazio di testa su strumentazione GC 1000" con auto campionatore "Dani HSS 86.50".

Risultati. Dall'esame dei dati si può notare come sia evidenziabile un'ottima correlazione tra il metodo enzimatico utilizzato in urgenza e il metodo gas cromatografico.

La retta di regressione dei campioni presi in considerazione evidenzia un'ottima correlazione tra le due metodiche: $R^2 = 0.917$, la maggior parte dei valori è compreso all'interno delle due DS ed il coefficiente che deriva dalla curva di Bland-Altman corrisponde a $R^2 = 0.0002$.

Discussione e Conclusioni. I nostri risultati confermano una sostanziale sovrapposibilità dei dati ottenuti dalla determinazione dell'alcolemia in gas cromatografia e quella effettuata con metodo enzimatico. L'effettuazione di un unico prelievo per l'alcolemia da parte del dipartimento di emergenza, potrebbe consentire una rapida processazione con metodo enzimatico ed una altrettanta immediata refertazione per forze dell'ordine. Il campione stesso potrebbe essere disponibile per eventuale conferma in gas cromatografia per i valori border line, superiori al limite di legge o per contestazioni.

Bibliografia

Society of Forensic Toxicology. www.soft-tox.org

253

VALUTAZIONE DI UN METODO RAPIDO DI SCREENING PER LA DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE D'ABUSO SU MATRICE CHERATINICA

S. Mazzolini¹, A. Colatutto¹, R. Zaglia¹, B. Marcon¹, L. Isola¹, N. Pradal¹, A. Cossettini¹, G. Barbina¹, A. Daminato¹, L. De Luca¹, A. Lerussi¹, P. Sala¹

¹Laboratorio Analisi Elezione, Az. Osp. Univ., S. Maria della Misericordia, Udine

Scopo del lavoro. E' stato quello di contribuire alla messa a punto di un metodo rapido di screening per la determinazione delle sostanze d'abuso (oppiacei, cocaina, cannabinoidi, amfetamine) su matrice cheratinica e confrontare i dati così ottenuti con la metodica di riferimento in campo tossicologico forense (gas cromatografica con rivelatore a spettroscopia di massa).

Materiali e Metodi. Presso l'Istituto di Analisi di Elezione dell'Ospedale di Udine sono stati analizzati 123 campioni di capelli provenienti dai SERT regionali. I campioni sono stati trattati in accordo al protocollo di lavoro in uso presso il nostro Istituto ed alle Linee Guida Internazionali che prevedevano un primo esame di screening con test immunometrico competitivo su strumento IL Ilab 650, previa digestione enzimatica con reagenti della ditta Microgenics, successivamente gli stessi campioni sono stati analizzati con un gas cromatografo Varian Gc 4000 con rivelatore a spettroscopia di massa.

Risultati. Dall'analisi dei campioni da noi realizzati possiamo mettere in evidenza che solamente il 16% dei campioni testati risulta essere complessivamente positivo: il 9% per oppiacei e derivati, il 7% per la cocaina e l'1% per i cannabinoidi. Il test di conferma in gascromatografia ha confermato le positività alle droghe d'abuso rilevate.

Discussione e Conclusioni. L'aumento delle richieste di determinazione di droghe d'abuso ha spinto i tossicologi alla costante ricerca di un metodo affidabile di screening per la determinazione delle droghe d'abuso su matrice cheratinica. L'utilità di tale metodo consente una immediata discriminazione tra campioni chiaramente negativi, che verranno subito refertati, e quelli positivi e/o borderline che saranno successivamente confermati con metodo gascromatografico con rivelatore a spettroscopia di massa. I dati del nostro lavoro depongono a favore del test di screening Microgenics su strumento Ilab 650 che consente un notevole sgravio di lavoro routinario permettendo di focalizzare l'attenzione su campioni positivi o borderline.

Society of Forensic Toxicology. www.soft-tox.org

254

IDENTIFICATION OF ITALIAN G6PD MUTATIONS BY USING MICROCAPILLARY ELECTROPHORETIC CHIPS

A. Minucci¹, E. Delibato², B. Giardina¹, E. Capoluongo¹
¹Laboratory of Clinical Molecular Biology, Catholic University of Rome, Italy

²Unit of Microbiological Food-Borne Hazards, National Centre for Food Quality and Risk Assessment, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Background. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is one of the most well-known human genetic defects, identified in more than 400 million subjects in the world.

The aim of this study is to present a new strategy of G6PD RFLP analysis optimizing it by using the the Experion system (BioRad), as compared with the classical gel electrophoresis.

Methods. We examined 70 G6PD-deficient patients, born in various areas of Italy.

In particular, the G6PD assay was performed by means of a commercially available kit for in vitro diagnostic use (Trinity, Biotech) and all samples were screened for the most frequent Italian mutations, by means of allele-specific PCR, followed by restriction fragment length electrophoresis. The identification of these mutations was performed using both the agarose gel electrophoresis methodology and a new electrophoretic system, namely the Experion automated electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, USA).

Results. The commonest identified variant observed in our patients were the G6PD Mediterranean one (75.7%), followed by G6PD Seattle (7.1%), G6PD A-202, A-376 (7.1%) and finally G6PD Cassano (2.8%). None of the 70 subjects was a G6PD Montalbano carrier. Only four subjects (0.4%) resulted negative for these five mutations.

For all the mutations analyzed, Experion provided the expected restriction patterns; only for the G6PD Cassano the pattern of the mutant individuals was different from that expected, due to the small difference in the fragment lengths, obtained by restriction enzymes. Therefore, Experion was able to recognize the mutant from the wild-type individuals.

Discussion. With the Experion method, the size band determination was more accurate than that obtained by gel electrophoresis. Our results indicate that the Experion system offers a greater reliability than the classical techniques; it permits a more accurate identification of the DNA fragment length as compared with the gel electrophoresis. Furthermore, Experion system is very simple to use and may be placed in a non- dedicated area of the laboratory since the hazardous post-PCR procedures are eliminated, such as the employment of ethidium bromide or the acrylamide.

Finally, the present method should be considered a new valid alternative for a more accurate identification of the restriction patterns of the some G6PD mutations.

255

VALUTAZIONE DI UN NUOVO SISTEMA AD ALTA AUTOMAZIONE PER IL DOSAGGIO DELLE PROTEINE SPECIFICHE

F. Panichi¹, L. Vecchia¹

¹Laboratorio di Microbiologia, Sierologia e Virologia, Azienda Ospedaliera S. Maria Nuova, Reggio Emilia

Obiettivi. Valutare l'affidabilità dei dosaggi per proteine specifiche su analizzatori per chimica clinica (Abbott Architect c8000) inseriti in un sistema di Total Lab Automation (FlexLab), verificandone sia la correlazione con altri metodi commerciali su parametri di routine che le performances analitiche.

Metodi. Sono stati valutati 3 parametri (TAS, PCR e RF) effettuando le analisi con metodica immunoturbidimetrica sul sistema Architect c8000 e sul nefelometro Behring BNA II.

Correlazione: per RF sono stati confrontati 135 campioni nell'intervallo 0-700 UI/ml. Per PCR sono stati confrontati 294 campioni nell'intervallo 0-28 mg/dl. Per TAS sono stati confrontati 122 campioni nell'intervallo 0-1000 UI/ml.

La precisione intrarun è stata valutata su un pool di campioni con concentrazione attorno al livello decisionale (21 repliche), utilizzando il dosaggio TAS come test campione.

Risultati. Il confronto tra metodi, effettuato con la regressione di Passing e Bablok ha evidenziato un grado elevato di correlazione in tutto il range analitico:

TAS: 0.708; 95%CI 0.686-0.733

RF:1.211; 95%CI 0.978-1.393

PCR:1.065; 95%CI 1.052-1.077

Anche la concordanza clinica è risultata molto elevata: (TAS 96,7%, RF 94,1%; PCR: 97.3%; tutti i campioni discordanti si trovavano intorno al valore di cutoff dei metodi).

La precisione è risultata molto buona e superiore al metodo utilizzato per la routine, CV <1%.

Discussione. Le caratteristiche analitiche del sistema Architect c8000 sono apparse molto soddisfacenti e i metodi valutati hanno mostrato un'ottima correlazione con altri test attualmente impiegati nella routine. La precisione dei dosaggi è particolarmente elevata.

Le caratteristiche operative dell'analizzatore ARCHITECT c8000 inserito in un sistema di trasporto campioni automatizzato (FlexLab) rendono possibile ed agevole il consolidamento dei dosaggi per proteine specifiche all'interno dei dosaggi di routine, migliorando ulteriormente l'efficienza complessiva del sistema.

256

RELIABILITY AND CORRELATION STUDY OF A NEW HOMOCYSTEINE ASSAY

S. Persichilli¹, J. Gervasoni¹, D. De Martino², A.

Vitrani², D.E. Capoluongo¹, B. Giardina¹, F.

Iavarone¹, B. Zappacosta²

¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche "Giovanni Paolo II", Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

Background. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cardiovascular, cerebrovascular diseases¹. A lot of homocysteine assays have been developed from the sixties and most of companies have commercially available kits for homocysteine determination. In this paper we report the performance characteristics of the new Architect Homocysteine (HCY) Assay and the correlation with HPLC and other routine analytical methods

Methods. Recovery, limit of detection (LOD), total imprecision and interferences were evaluated; furthermore, the method was compared with HPLC and with two routine methods.

Results. Recovery is higher than 95%, LOD was lower than 1.0 $\mu\text{mol/L}$, the range for total imprecision was 1.7-3.8%. No significant degree of interference was observed up to 5 g/L haemoglobin, 20 mg/dL bilirubin and 6000 mg/dL triglycerides.

For the comparison study, this new method shows a little positive bias with the HPLC (mean \pm SD: 0.03 \pm 1.7 $\mu\text{mol/L}$) with $R^2=0.96$, a positive bias with the immunonephelometric method (mean \pm SD: 1.7 \pm 1.2 $\mu\text{mol/L}$) with $R^2=0.98$, and a negative bias with the enzymatic method (mean \pm SD: -1.8 \pm 2.2 $\mu\text{mol/L}$) with $R^2=0.94$.

Conclusion. This new method from Abbott can be included among the methods suitable for homocysteine routine analysis.

Reference

1. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. Clin Chem 2004;50:3-32.

257

VALUTAZIONE DI UN NUOVO SISTEMA IN CHIMICA LIQUIDA PER L'ANALISI DELLE URINE IN AUTOMAZIONEA. Recchioni¹, L. Medici¹, C. Galli², M. Pisani²¹Laboratorio Analisi, ASUR 10 Camerino, San Severino²Abbott Divisione Diagnostici, Roma

Obiettivi. L'esame chimico-fisico delle urine viene generalmente eseguito con in chimica secca su analizzatori dedicati. Scopo dello studio è valutare l'applicabilità del dosaggio delle urine su strumentazione aperta di chimica clinica (Abbott ARCHITECT c8000) verificandone la praticabilità e la correlazione con altri metodi commerciali.

Metodi. Sono stati valutati 8 parametri (Bilirubina, Glucosio, Corpi Chetonici, Nitriti, Peso specifico, Emoglobina, Proteine Urinarie, pH urinario) su 65 campioni, analizzati sia con metodica colorimetrica Urinext TM applicata sull'analizzatore Abbott ARCHITECT c8000 che sul sistema utilizzato in routine (Menarini-Aution Max).

Risultati. E' stato possibile applicare su ARCHITECT c8000 tutti i dosaggi ed i campioni sono stati tutti dosati. Il confronto tra metodi ha evidenziato una buona concordanza su: Glucosio, Bilirubina, pH, Proteine e Peso Specifico. E' tuttora in corso la valutazione delle soglie per i metodi quantitativi che garantiscano una correlazione migliore per: Corpi chetonici, Nitriti, Emoglobina.

La correlazione è stata calcolata solo su alcuni parametri a causa dello scarso numero di campioni quantizzabili con il sistema Menarini, che adotta inoltre principalmente metodi semiquantitativi: Glucosio R2=0,97, Proteine R2=0,34, pH R2=0,86.

Discussione. La correlazione fra metodi è apparsa difficile a causa della differente tecnologia che impone la scelta di "range" di normalità a volte molto diversi fra loro. Le caratteristiche operative del sistema ARCHITECT c8000 sono apparse molto soddisfacenti ed hanno permesso una rapida e semplice applicazione dei dosaggi per urine in chimica liquida. Questo rende disponibili i singoli parametri diagnostici dell'esame urine in forma di reagenti liquidi e completamente automatizzabili. E' inoltre possibile personalizzare il pannello di esami in base al reparto di provenienza del campione. Di notevole utilità appare la possibilità di refertare risultati quantitativi e di dosare, tramite diluizioni automatiche, anche campioni che nei dosaggi semiquantitativi oltrepassano il range di linearità. In conclusione risulta possibile ed agevole il consolidamento dei dosaggi per urine su analizzatori di chimica clinica migliorando ulteriormente l'efficienza complessiva del laboratorio.

258

VALUTAZIONE DEL TEST "QUANTIFERON TB-GOLD IN TUBE" IN ETA' PEDIATRICA, PRESSO IL LABORATORIO ANALISI DI FORLI'R. Nunziatini¹, L. Pezzi¹, R. Agnoletti¹, R. Dorizzi¹, G. Timoncini², R. Francavilla²¹U.O. Lab. Analisi, Osp. Morgagni-Pierantoni, AUSL, Forlì²U.O. Pediatria, Osp. Morgagni-Pierantoni, AUSL, Forlì

Scopo dello studio. Lo scopo del lavoro è la valutazione dell'affidabilità clinica del test come metodo di rivelazione di infezione tubercolare nella popolazione pediatrica; non esiste, infatti un metodo di riferimento nella diagnostica della tubercolosi (TB) latente.

Materiali e metodi. Sono stati valutati i risultati di 53 bambini afferiti alla U.O. di Pediatria dell'Ospedale di Forlì, suddivisi in due gruppi:

1) GRUPPO SCREENING comprendente 38 bambini di età compresa tra 2 e 16 anni provenienti da zone ad elevata endemia, sottoposti a vaccinazione con BCG certificata o verificata mediante ricerca della cicatrice cutanea, risultati positivi allo screening anti TB mediante Mantoux (infiltrato # 5 mm) effettuato all'arrivo in Italia, asintomatici e negativi all'esame radiografico, nei quali è stata eseguita la determinazione del Quantiferon;

2) GRUPPO CONTATTI comprendente 15 bambini di età compresa tra 6 mesi e 16 anni, con parente affetto da TBC polmonare bacillifera, con positività alla Mantoux (#10 mm) nei quali è stata eseguita la determinazione del Quantiferon.

Risultati. Solo 2 dei 38 bambini del gruppo screening presentavano un infiltrato <10 mm e il test Quantiferon è risultato positivo in 8 casi (21%) e in particolare in un caso con l'intradermoreazione alla tubercolina (TST) di 8mm di diametro. Il Quantiferon è risultato positivo in 14/15 (93% dei casi) dei bambini del gruppo contatti (12 avevano avuto un contatto di tipo intrafamiliare). La differenza è risultata statisticamente significativa (chi-quadro = 19.025; p < 0.0001).

Il caso risultato negativo si riferisce ad un paziente di nazionalità italiana, non vaccinato, con Mantoux di 9 mm, contagiato in ambiente scolastico da Micobatteri atipici.

Conclusioni. I risultati ottenuti confermano l'affidabilità del test "Quantiferon-TB Gold In Tube" come strumento diagnostico anche nella popolazione pediatrica permettendo di riconoscere l'infezione nei soggetti vaccinati.

Bibliografia

Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: New Tests for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: Areas of uncertainty and raccomandations for Research. *Ann Intern Med* 2007;146:340-54.

259

EVALUATION OF MULTIGENT® CREATININE (ENZYMATIC) LIQUID ASSAY ON THE ABBOTT ARCHITECT® C8000 AND AEROSET® CLINICAL CHEMISTRY SYSTEMS

F. Magro¹, F. Rota¹, H. H. Markle², B. Nance²

¹Sentinel CH., Milan, Italy

²Abbott Diagnostics, Irving, Texas

Objective. The MULTIGENT Creatinine (Enzymatic) Liquid assay was evaluated on the ABBOTT ARCHITECT c8000 and AEROSET Clinical Chemistry Systems. Goals of the study were to verify the analytical performance and establish this assay's agreement with the NKDEP recommendations for serum creatinine measurement when compared with a similar enzymatic assay.

Materials/instruments. MULTIGENT Creatinine (Enzymatic) Liquid reagent, manufactured by SENTINEL CH., is based on the enzymatic conversion of creatinine to sarcosine, then oxidation by sarcosine oxidase to produce hydrogen peroxide that reacts in a modified Trinder reaction. The assay is standardized against NIST SRM967 and thus traceable to IDMS. Abbott's ARCHITECT c8000 and AEROSET Systems are random-access clinical chemistry analyzers. ARCHITECT c8000 can be integrated with ARCHITECT i2000SR, an immunoassay module, to form the ci8200.

Design study. Acceptance criteria were set at <3.6% CV for total precision and at \leq 8% for accuracy throughout the study, including calibration stability. LOQ was defined as the analyte concentration at which the Total error was less than 15%. Analytical measurement range was defined through linearity. Method comparison was evaluated by comparing ARCHITECT and/or AEROSET results for patient serum samples with results from a Hitachi-911 system running the Roche Creatinine Plus enzymatic assay. Interference due to endogenous substances and drugs was investigated following CLSI EP7-A2.

Results on ARCHITECT c8000 and Aeroset:

Linearity: 0.10 to 40.00 mg/dL; max Total imprecision 3.2% at 0.65 mg/dL; LOB 0.02 and LOQ 0.092 mg/dL. Comparison vs. Roche assay on Hitachi 911 gave: n 94; range 0.32 to 38.58; slope 1.01; intercept -0.100, r 0.999. Interfering substances (max allowable bias: 8%): Bilirubin (conjugated 39.6 mg/dL, unconjugated 46.2 mg/dL), Hemoglobin (1000 mg/dL), Intralipid (2000 mg/dL), Creatine (100 mg/dL), Ascorbate (120 mg/dL) and Glucose (6000 mg/dL) did not interfere. Of 18 drugs tested, only α -methyldopa interfered.

Conclusion. Performance of the MULTIGENT Creatinine (Enzymatic) assay meets and exceeds the NKDEP recommendations for Serum Creatinine measurement on both ABBOTT systems. Sixty-day calibration stability and robustness to interferences make this assay very suitable for the routine measurement of this critical analyte.

260

EVALUATION OF SENTINEL CH. SPECIAL ASSAYS ON THE ABBOTT ARCHITECT® C16000 CLINICAL CHEMISTRY SYSTEM

L. Ruggero¹, R. Dioli¹, E. Marelli¹, F. Rota¹, M. Fritz², H. Troonen²

¹Sentinel CH., Milan, Italy

²Abbott GmbH & Co. KG, Diagnostics, Delkenheim, Germany

Objective. To demonstrate optimization of clinical laboratory workflow through consolidation of assays on a high-throughput clinical chemistry analyzer, the analytical performance of some assays was evaluated on the recently introduced ABBOTT ARCHITECT c16000. The ARCHITECT c16000 is a high-throughput analyzer that can be a stand-alone instrument or integrated with the ARCHITECT i2000 (the immunoassay module) as the ARCHITECT i16200SR. The ARCHITECT c16000 Clinical Chemistry system uses the same proven commodities, calibrators, reagents, photometric technology and Integrated Chip Technology (ICT) as used on the ABBOTT AEROSET and ARCHITECT c8000 systems. **Methodology.** Evaluations were based on a CLSI-derived equivalence protocol. Predefined acceptance criteria were: Total imprecision \leq 10% CV; Linearity \pm 5% from current linearity claim; Method Comparison correlation coefficient (r) \geq 0.975, slope = 0.90-1.10. The analytical measurement range (AMR) was defined through linearity and sensitivity. **Results:**

Fructosamine (μ mol/L): Max Total precision was 3.4%. Comparison: n=60; slope=1.07; r=0.998. AMR: 11–1168

CK-MB (U/L): Max Total precision was 7.5%. Comparison: n=60; slope=0.98; r=0.999. AMR: 3–1035

Kappa light chains (mg/dL): Max Total precision was 3.8%. Comparison: n=60; slope=0.94; r=0.996. AMR: 4–945

Lambda light chains (mg/dL): Max Total precision was 0.7%. Comparison: n=60; slope=0.94; r=0.981. AMR: 3–1107

Bile acids (μ mol/L): Max Total precision was 7.0%. Comparison: n=60; slope=1.00; r=1.000. AMR: 1–206

Copper (μ g/dL): Max Total precision was 1.5%. Comparison: n=60; slope=0.97; r=0.995. AMR: 3–866

Dibucaine CHE Liquid (U/L): Max Total precision was 5.8%. Comparison: n=60; slope=0.93; r=0.982. AMR: 44–20000

HBDH (U/L): Max Total precision was 1.6%. Comparison: n=60; slope=0.99; r=0.995. AMR: 9–1738

Conclusion. Evaluation data demonstrated excellent equivalence between the AEROSET and the c16000 clinical chemistry analyzers. Validation of these assays on c16000 allows the consolidation of these assays, characterized by low frequency of clinical requests, with general chemistry assays on a single high-volume chemistry analyzer, which optimizes workflow and laboratory efficiency, reducing costs in today's laboratories.

261

EVALUATION OF SOME SENTINEL CH. SERUM PROTEINS ASSAYS ON THE BECKMAN COULTER SYNCHRON® LX CLINICAL CHEMISTRY SYSTEMA. Mezzadra¹, R. Dioli¹, F. Rota¹¹Sentinel CH SpA, Milan, Italy

Objective. Analytical performance of some SENTINEL protein assays were evaluated on the Beckman Coulter Synchron® LX Clinical Chemistry System. The goal of the study was to support the efforts of Clinical laboratories to consolidate all the Protein panel on one unique instrument platform, thus maximizing the overall lab workflow, by performing some proteins on large throughput analysers. The Synchron® LX20 is a fully automated, high-throughput clinical chemistry system, which can run colorimetric, enzymatic as well as turbidimetric assays.

Methodology. The evaluation of Kappa and Lambda light chains, Alpha 1-Acid Glycoprotein and Lipoprotein(a) (Lp(a)) on Synchron® LX was based on CLSI derived protocols and on predefined acceptance criteria. Method Comparison was evaluated by comparing the measurements of paired serum samples on Synchron LX and on Beckman Coulter reagents/Immagine® nephelometer system. On Board stability was tested in terms of open reagents and calibration. Imprecision was verified on minimum 2 analyte concentrations. LOD was defined as the analyte concentration equivalent to 3 x the SD measured from 20 replicates of saline.

Results. Kappa light chains (mg/dL): LOD 2.36; max Total Imprecision was 6.73%; No prozone effect to 12032; 28 days On Board calibration stability; Comparison to Image assay (n 79) gave slope 0.92, intercept 89.2 and r 0.978. Lambda light chains (mg/dL): LOD 2.15; max Total Imprecision was 4.71%; No prozone effect to 6336; 28 days On Board calibration stability; Comparison to Image assay (n 79) gave slope 0.98, intercept 17.74 and r 0.985.

Alpha1acid Glycoprotein(mg/dL): LOD 29.8; max Total Imprecision was 7.9%; No prozone effect to 1825; 28 days On Board calibration stability; Comparison to Image assay (n 60) gave slope 1.06, intercept 0.58 and r 0.991.

Lipoprotein(a) mg/dL): LOD was 1.4; max Total Imprecision was 4.4%; No prozone effect to 358; 14 days On Board calibration stability; Comparison to Image assay (n 57) gave slope 1.01, intercept -1.99 and r 0.981.

Conclusion. Obtained data met the predefined acceptance criteria and proved the feasibility to run Kappa, Lambda light chains, Alpha 1-acid glycoprotein and Lp(a) with general chemistry assays. The study supported the consolidation of proteins on Synchron® LX, which the optimization of workflow and laboratory efficiency reducing costs in today's laboratories.

262

STABILITA' CAMPIONI PER RICERCA SANGUE OCCULTO FECALE (FOBT) COL METODO OC SENSOR-MICROT. Rubeca¹, M. Confortini¹, L. Cilumbriello¹, S. Salti², P. Pezzati¹, S. Rapi²¹U.O. Citologia Analitica e Biomolecolare, ISPO, Firenze, Italy²Lab. Generale, Dip Lab, AOU Careggi, Firenze, Italy

Introduzione. I programmi di screening per il carcinoma del Colon Retto si avvalgono della raccolta domiciliare del materiale biologico da parte dell'utente e della sua consegna ad un centro di raccolta intermedio che procede poi alla consegna o dell'invio postale dei campioni al Laboratorio incaricato di eseguire le analisi. In questo contesto la valutazione dell'effettiva stabilità del materiale negli specifici flaconi di raccolta riveste un'importanza cruciale per la messa a punto di programmi di screening analiticamente validi. Nel presente studio è stata valutata in dettaglio la stabilità dell'Emoglobina (HB) su campioni biologici raccolti con i flaconi OC Sensor-u (Eiken).

Materiali e metodi. sono state studiate le variazioni percentuali di 6 pool di campioni a differente concentrazione di emoglobina (Range: 139-771) conservati in frigorifero (modalità conservazione centri raccolta) ed a -20°C.

Sono state eseguite 8 ripetizioni di ogni campione ai gg 1-2-3-5-7-14-21. e sono state valutate le variazioni % assumendo come valore atteso la risposta fornita il giorno. L'imprecisione del sistema analitico nel periodo di studio è stata seguita secondo le normali procedure analitiche con 2 livelli di controllo ottenendo un cv<5%. E' stato valutato lo spostamento percentuale nel tempo dei pool analizzati e della media degli spostamento ottenuti nel periodo di studio.

Risultati. Tutte le variazioni registrate indicano una diminuzione dei livelli di HB.

Conservazione 4°C: variazione Media 5.5% 10gg; 7.8% 21gg. I campioni a concentrazione più alta (>230) mostrano variazioni <10% nell'intero periodo considerato, i campioni a concentrazione minore (139-141) mostrano una diminuzione <10% nei primi 10gg e variazioni <13% entro i 21gg.

Conservazione -20°C: variazione Media 5.5% 10gg; 6% 21gg

Discussione. Già alcuni lavori presentati in letteratura indicavano una buona stabilità dei campioni utilizzati per il FOBT 1) i nostri dati confermano o una costante ma leggera diminuzione dei livelli di HB, una buona stabilità del materiale conservato a 4°C, nei primi 10gg dalla raccolta e variazioni >10% soltanto in alcuni dei campioni dopo 21gg. La conservazione a -20°C non sembra in grado di garantire una migliore stabilità per periodi <21gg.

Bibliografia

1. Am J Gastroenterol 2005 Nov;100(11):2519-25.

263

EVALUATION OF A NEW ENZYMATIC METHOD OF HOMOCYSTEINE MEASUREMENT ON COBAS 6000 ROCHE

D. Scribano¹, S. Di Leva¹, J. Gervasoni¹, S. Persichilli¹, B. Zappacosta², C. Zuppi¹

¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

²Centro di Ricerca e Formazione ad alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

Background and objectives. In clinical practice homocysteine (Hcy), a sulphur amino acid closely related to methionine metabolism, is considered an independent risk factor for cardiovascular disease. The request to clinical laboratories for Hcy measurement is constantly increased and thus several new methods have been developed, mainly with the aim of using them on completely automated instruments. In this study we compared data obtained from a new enzymatic method with data obtained from the HPLC reference method.

Patients. One hundred and fifty serum samples from apparently healthy subjects (80 males and 70 females; age 25-70 years) were analyzed for total Hcy (tHcy) by the two methods.

Methods. The Diazyme enzymatic test, automatized on Cobas 6000 Roche, is based on a novel assay principle that assesses the co-substrate conversion product. In the assay, oxidized Hcy is first reduced to free Hcy which then reacts with a co-substrate S-adenosyl-methionine (SAM), catalyzed by a homocysteine S-methyltransferase. The co-substrate conversion product is amplified by coupled enzymatic cycling reactions. The tHcy level in the sample is indirectly proportional to the amount of NADH conversion to NAD⁺. The Diazyme HCY enzymatic assay has been formulated into a 3-reagent, homogeneous liquid system, ready for use and a liquid HCY calibrator (50 µM).

HPLC: tHcy was measured according to the method of Araki and Sako with slight modifications (1).

Results. The Diazyme test showed a good correlation with HPLC ($y=1.56x-2.83$, $R(2)=0.97$).

Precision studies were obtained with a serum pool at Hcy 12 µM/L. The within run CV was 2.3%, instead the between run CV were 4.3%. The recovery studies, obtained by adding different Hcy aliquots (final concentration 25, 50, 100 µM), showed a recovery higher than 94%. The found linearity corresponds to declared linearity by manufacturer (2.8-50µM/L).

Conclusions. This method is suitable for routine analysis; in fact, it is well correlated with the reference HPLC method and it may be executed on a single analyzer as Cobas 6000 Roche with reducing technical work.

Reference

1. De Stefano V, Zappacosta B, Persichilli S, et al. Prevalence of mild hyperhomocysteinemia and association with Thrombophilic genotypes (Factor V Leiden and factor II G20210A) in Italian patients with venous thromboembolism disease. *Br J Haematol* 1999;106:564-8.

264

DETERMINAZIONE DELL'EMOGLOBINA GLICATA: VALUTAZIONE DEL NUOVO METODO ABBOT AXSYM HbA1c

F. Balboni¹, A. Terreni², G. Andreani³, B. Morrocchi¹, A. Caldini², N. Della Malva¹, C. Martinelli³, A. Del Genovese³, G. Messeri²

¹Laboratorio Analisi, IFCA, Firenze

²Laboratorio Generale, Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, AOUC, Firenze

³Laboratorio Analisi Biochimiche Cliniche e Microbiologiche, ASL 1, Massa Carrara

Introduzione. L'emoglobina glicata (HbA1c), marker a lungo termine dello stato glicemico, è il parametro di elezione nella gestione del paziente diabetico. Scopo del lavoro è stato quello di valutare la nuova metodica immuno-chimica ABBOTT AxSYM HbA1c, con rivelazione in fluorescenza mediante sistema ottico MEIA, confrontandola con due metodi HPLC (Bio-Rad Variant II Dual Kit Program e HLC-723 G7 Tosoh Co).

Materiali e metodi. L'imprecisione è stata valutata secondo le linee guida NCCLS (EP5-A2) analizzando in duplicato per 20 giorni due livelli di sangue di controllo. Lo studio di confronto è stato eseguito in accordo alle linee guida NCCLS EP9-A2 su 62 campioni in un ampio range di concentrazione di HbA1c (da 4.7% a 12.3%).

Risultati. I risultati di imprecisione ottenuti sui campioni di controllo normale e patologico entro la serie, tra le serie e totale espressi come CV% sono rispettivamente 1.79, 3.85 e 4.24 e di 2.20, 8.83 e 9.10. La regressione di Deming tra i risultati forniti da Variant vs Abbott e Tosoh vs Abbott mostra rispettivamente una slope di 0.87 e 0.91 e un'intercept di 0.71 e 0.47 con un r di 0.93 e 0.94. I risultati dell'analisi di Bland-Altman mostrano una differenza media di -0.87% fra Abbott e Variant (I.C.95% da -1.74 a 1.48), -0.93% fra Abbott e Tosoh (I.C. 95% da -1.67 a 1.42).

Conclusioni. Considerando che una riduzione del 10% di HbA1c è associata ad una riduzione del 45% del rischio di progressione delle complicanze diabetiche (1), è raccomandabile utilizzare metodiche a bassa imprecisione: è stato infatti proposto come traguardo analitico un errore totale del 6.2%. (2). Il nuovo metodo Abbott AxSYM HbA1c mostra una buona correlazione con le metodiche in HPLC e un'imprecisione entro le specifiche richieste.

Bibliografia

1. American Diabetes Association. Implications of the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2000;23:24-6.

2. Mosca A, Paleari R. Standardizzazione dell'emoglobina glicata nell'ambito dello studio DAL. *Ann Ist Super Sanità* 2003;39(2):145-51.

265

VALUTAZIONE DEL METODO VIDAS BIOMERIEUX PER LA MISURA DELL'NT-PROBNP: RISULTATI PRELIMINARIA. Terreni¹, A. Caldini¹, F. Pirolò¹, G. Avveduto¹, A. Ognibene¹, G. Messeri¹¹Laboratorio Generale, Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

Introduzione. L' N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) rappresenta oggi un utile indicatore biochimico di scompenso cardiaco (1). Scopo del lavoro è confrontare il nuovo test di dosaggio dell' NT-proBNP (ELFA), recentemente sviluppato da Biomerieux su analizzatore Vidas, con il metodo ECLIA (Roche Diagnostics) implementato su Modular 180.

Materiali e metodi. Per la valutazione dell'imprecisione sono stati analizzati due campioni di controllo a livello basso (217-323 pg/mL) e a livello alto (3530-4890 pg/mL) 2 volte al giorno per 20 giorni secondo il protocollo NCCLS (EP5-A2). Il confronto tra i risultati ottenuti con le due metodiche è stato eseguito su 75 campioni di siero (range da 7.4 a 39332 pg/mL) seguendo le linee guida NCCLS EP9-A2. I risultati sono stati valutati utilizzando la regressione Deming e l'analisi di Bland-Altman.

Risultati. L'imprecisione entro la serie, tra le serie e totale, espressa come CV%, è risultata per il campione di controllo a livello basso rispettivamente 3.36, 3.76 e 5.04, mentre per il campione di controllo a livello alto rispettivamente 2.37, 3.35 e 4.10. L'analisi dei risultati ottenuti con le due metodiche sui 75 campioni di siero tramite la regressione di Deming evidenzia un coefficiente angolare di 1.00 e un'intercetta di 126.27 ($r = .99$). L'analisi di Bland-Altman mostra una differenza media di -9.89% (95%I.C. da - 3423.91 a 3335.30 pg/mL). La regressione per eliminazione (NT-proBNP <1000pg/mL) ha fornito un coefficiente angolare 1.07 e un'intercetta 16.78 ($r=0.98$). L'analisi di Bland-Altman mostra una differenza media di - 14.7% (95%I.C. da - 192.72 a 110.9 pg/mL). La concordanza complessiva tra i due metodi è risultata del 98.6%, con un solo campione che è risultato al di sopra del range di riferimento solo con il metodo Roche.

Conclusioni. La correlazione tra il nuovo metodo NT-proBNP Biomerieux e il metodo Roche è risultata complessivamente buona, come era ipotizzabile dal momento che i due metodi utilizzano lo stesso anticorpo. Il prevedibile aumento delle applicazioni cliniche della misura dei peptidi natriuretici, rende auspicabile lo sviluppo di metodi facilmente eseguibili anche in regime d'urgenza, come il metodo NT-proBNP Biomerieux.

Bibliografia

1. Clerico A et al. Clin Chem 2007;53:813-22.

266

PERFORMANCE OF THE AUTOMATED AND RAPID HEMOSIL HOMOCYSTEINE ASSAY ON THE ACL TOP ANALYZERG.L. Salvagno¹, G. Lippi¹, M. Montagnana¹, E. Danese¹, M. Gelati¹, A. Bassi¹, G.B. Faccini¹, L. Rossi¹, G. Poli¹, G.C. Guidi¹¹Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona

Background. Hyperhomocysteinemia is receiving growing interest as risk factor for cardiovascular disease, leading to increased demand for rapid and inexpensive measurements. Accordingly, the introduction of simple automated assays is advisable, and several automated methods are now becoming commercially available, although most of these are not suited for the majority of clinical laboratories. Aim. The aim of this study was to compare the analytical performances of three automated commercially available Hcy assays with the reference HPLC method.

Methods. Four K2 EDTA plasma aliquots were assayed simultaneously with the current reference HPLC method and the followings three novel immunoassays: HemosIL HCY on ACL top analyzer, Instrumentation laboratory; N latex HCY on BNII, Siemens; Immulite HCY on Immulite 2000, Siemens).

Results. The within- and between-run coefficients of variations of Hemosil Hcy at low (8.9mmol/L) and high (21.3 mmol/L) Hcy concentrations were: 4.2-5.9% and 3.3-3.6%, respectively. The assay was proven linear in a range of Hcy concentrations comprised between 7.3 and 46.1 mmol/L, as confirmed by the the linear regression analysis ($y = 1.006x - 1.18$) and the relative correlation coefficient ($r=0.997$, $p<0.001$). Results of K2-EDTA plasma samples ($n=82$) were compared with those of the reference commercial HPLC method. The median values (2.5-97.5 percentiles) of the samples were: 13.4 mmol/L (7.1-40.0 mmol/L) for HPLC, 10.2 mmol/L (5.4-32.6 mmol/L) for HemosIL, 12.8 mmol/L (6.8-31.9 mmol/L) for N Latex HCY and 13 mmol/L (7.1-43.6 mmol/L) for Immulite HCY. The nonparametric regression according to the method of Passing & Bablok and the relative Spearman's correlation coefficient showed excellent performance for Hemosil HCY (HemosIL HCY= $0.78 \times \text{HPLC} - 0.15$; $r = 0.96$, $p<0.001$). The others two assays showed worse performances (N Latex HCY= $0.69 \times \text{HPLC} - 2.49$; $r = 0.73$, $p<0.001$; Immulite HCY= $0.94 \times \text{HPLC} - 0.26$; $r = 0.84$, $P < 0.001$).

Conclusion. We conclude that the analytical performance and the technical features of new HemosIL Hcy assay make it a suitable assay for the rapid quantification of Hcy. The use of a single plasma specimen for both Hcy and coagulation testing is an additional advantage of this method.

267

COMPARISON METHODOLOGY FOR THE STUDY OF HAEMOGLOBIN BETWEEN LINEAR GRADIENT HPLC AND STEP GRADIENT HPLC

R. Li Muli¹

¹*U.O. Ematologia II con Talassemia, Osp. Vincenzo Cervello, Palermo*

In the study of the bearer healthy Haemoglobinopathies is of particular importance in determining of Hb A₁ and Variants Haemoglobin run with the HPLC technique. There are different methodologies HPLC that differ because of the nature of resin and different type gradient used.

In this work we present data obtained from the study of haemoglobin with two different types of HPLC, focusing on subjects with value Hb A₁ borderline between 3.2% and 3.7% (given the high genetic diversity in the population of Sicily) and subjects with Variants Haemoglobin. All samples tested were subjected to molecular analysis to confirm the presence or absence of thalassemic mutations of globin genes (alpha, beta and delta) and / or the presence of specific haemoglobin variants. It was used a HPLC "continuous gradient" in which the composition of mobile phase varies on a continuous mixing solvents with different ionic strength. That aim has been using a commercial kit.

For the evaluation of a "Step Gradient" HPLC in which the composition of mobile phase varies in a controlled manner (steps) during the analysis has made use of the kit "β-thalassaemia Tosoh G7" of Tosoh Bioscience.

Results. It was found more subjects with Hb A₁ borderline, with no mutation α and β globin genes using the methodology with continuous gradient while the method that uses elution "Step gradient" measured worth Hb A₁ on average less than 0.2 to 0.4%.

It was also observed better separation of some variants Haemoglobin run with "Step gradient" and in particular: a) better separation of variants that co-elute after Hb A₁ such as Hb Lepore and HbE. b) better separation of Delta Variants as the Cod 5, that co-elute with Hb A₁ using continuous gradient. Some variants haemoglobin that co-elute with the HbA are separated in a more discriminating elution with a "continuous gradient".

268

PERFORMANCE OF THE AUTOMATED AND RAPID FERRITIN ASSAY ON THE MODULAR E SYSTEM

G.L. Salvagno¹, O. Ruzzenente¹, M. Montagnana¹, E. Danese¹, M. Gelati¹, G. Brocco¹, F. Dima¹, G.

Lippi¹, G.C. Guidi¹

¹*Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università di Verona, Italy*

Background. Iron deficiency anaemia is a major public health problem worldwide. Serum ferritin concentration is a sensitive measure of body iron stores and it is recommended as the screening test to identify iron deficiency. Accordingly, the introduction of simple automated assays is advisable, and several automated methods are now becoming commercially available on clinical chemistry analyzers.

Aim. The aim of this study was to compare the analytical performances of the new Ferritin Roche assay with the our reference method.

Methods. Two serum aliquots were assayed simultaneously with the Liaison Ferritin assay (Diasorin) and the new fully automated method on Modular E (Roche).

Results. The within- and between-run CV (n=12) of the Roche assay at low (20 ng/mL) medium (118 ng/mL) and high (552 ng/mL) ferritin concentrations were: 2.5-3.6%, 1.4-2.9% and 1.3-2.7%, respectively. The assay was linear in a range of ferritin concentrations between 15 ng/mL and 1971 ng/mL, (linear regression analysis: $y = 0.0005x - 0.0087$; $r=0.999$, $p<0.001$). Results of serum samples (n=71) were compared with those of the Liaison method. The median values (2.5-97.5 percentiles) of the samples were: 316 ng/mL (12-3358 ng/mL) for Liaison and 360 ng/mL (13-2987 ng/mL) for Roche. The nonparametric regression according to the method of Passing & Bablok and the relative Spearman's correlation coefficient showed excellent inter-assay comparability (Roche = 1.03 x Liaison - 12.25; $r = 0.97$, $p<0.001$).

Conclusion. The new ferritin assay on the Modular E displays good analytical performances, making it a suitable method for the rapid quantification of ferritin, along with other parameters, on the Modular fully automated clinical chemistry analyzer.

269

EVALUATION OF A DEVELOPMENT VERSION OF THE ELECSYS HIGH SENSITIVE TROPONIN T ASSAY

A. Dolci¹, S. Braun², A.S. Jaffe³, A. Mühlbacher⁴, G. Muscillo¹, C. Olvén⁵, A.K. Saenger³, S. Sethi⁶, P. Venge⁵, K. Hallermayer⁷, J. Jarausch⁷, M. Panteghini¹

¹Azienda Ospedaliera Luigi Sacco, Milan, Italy

²Deutsches Herzzentrum München, Germany

³Mayo Clinic, Rochester, USA

⁴Transfusionsmedizin, Universitätskliniken Salzburg, Austria

⁵Uppsala University Hospital, Sweden

⁶National University Hospital, Singapore

⁷Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

A development lot of a new high sensitive assay for cardiac troponin T (cTnT), Elecsys hs TnT, was evaluated at 6 evaluation sites on Elecsys 2010, e 411 and E170 analyzers. The new Elecsys cTnT assay utilizes the same antibodies, which are used in the 4th generation assay. The intra- and inter-assay imprecision was determined in two control materials and six serum or plasma pools in the range between 2 and 2940 ng/L. Intra- and inter-assay CVs above 10 ng/L were between 0.58 % and 9.5 % (intra-assay, 21 replicates) and 0.84 % and 12.7 % (total CVs, 20 runs, 40 replicates), respectively. 10% total CV was obtained at ~12 ng/L. Method comparison to the 4th generation cTnT assay was performed using 840 routine samples in the range between 10 ng/L and 9760 ng/L. Intercepts and slopes were calculated by Passing-Bablok regression analysis between 16 ng/L and 25 ng/L and between 0.93 and 1.01, respectively. Correlation coefficients were in a range between 0.987 and 0.998. Measuring results in samples of 1075 blood donors showed a maximal hs TnT result of 33 ng/L. The 99th percentile limit was determined at 13.5 ng/L. Preliminary reference values were determined in a reference population of 500 apparently healthy individuals between 20 and 70 years, which were matched for gender and age. The study confirmed the results observed in blood donors (99th percentile limit: 13.3 ng/L, 95% CI: 12.1 to 17.1). Males had significantly higher results than females ($P < 0.004$) and there was a significant dependence on age ($P < 0.01$). It is concluded that the development lot of the high sensitive Elecsys cTnT assay showed an excellent analytical performance also at very low troponin concentrations. Further investigations are needed to provide clinical interpretations for low troponin concentrations.

270

VALUTAZIONE DI UN NUOVO METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DELLE IgE TOTALI

R. Luciano¹, E. Misirocchi¹, R.L. Cuffari², F. Colistro¹, M. Muraca¹

¹Lab. Analisi, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma

²Lab. Ricerca e Sviluppo, Ditta Radim, Pomezia

Obiettivo dello studio è il confronto tra un nuovo metodo immunoenzimatico automatizzato per la determinazione delle IgE totali sullo strumento Rad120 Radim e quelli già standardizzati su Alisei della stessa ditta e su ImmunoCap250 Phadia, considerato metodo di riferimento. Sono stati studiati 113 sieri di pazienti allergologici tra 0 e 16 anni. Il limite di negatività è <20 IU/ml per il metodo Alisei, < 25 IU/ml per i metodi Rad120 e Phadia. Valori > 100 IU/ml sono stati considerati positivi, i valori intermedi dubbi. Il metodo su Rad120 impiega microparticelle magnetiche, anticorpi anti-IgE coniugati con fosfatasi alcalina, 4-metilumbelliferil-fosfato come substrato. Linearità, imprecisione e recupero sono state valutate con sieri standard a quantità nota di IgE. I calibratori consistono in 4 livelli scalari di IgE totali diluite in matrice sierica bovina (WHO 75/502 2nd International Standard IgE). Su 113 pazienti sono risultati negativi 30 per ImmunoCap, 41 per Alisei e 42 per Rad; Positivi 50 per ImmunoCap, 34 per Alisei e 43 per Rad; Dubbi 33 per ImmunoCap, 38 per Alisei e 28 per Rad. Sia il metodo Rad120 che il metodo Alisei hanno specificità del 96.7% rispetto all'ImmunoCap; il metodo Rad ha dimostrato rispetto al metodo Alisei maggiore sensibilità (79.6%vs.68%) e concordanza (79.6%vs.74.3%). Il coefficiente di correlazione sia per ImmunoCap-Alisei che per ImmunoCap-Rad è di 0.97. L'analisi Altman-Bland ha confermato questi risultati. La minore sensibilità del metodo Alisei nella fascia prossima al cut-off potrebbe essere in parte dovuta alla procedura di diluizione impiegata per estenderne il range. In conclusione, esiste buona concordanza tra i risultati ottenuti con i diversi metodi in esame. Tuttavia, il nuovo metodo Rad120 si dimostra maggiormente paragonabile al metodo ImmunoCap250 rispetto al metodo Alisei. Questi risultati indicano un progresso significativo nella standardizzazione della determinazione delle IgE Totali, con risultati più omogenei tra i metodi in commercio.

Bibliografia

1. Ishizaka K, Ishizaka T. Structural and biological characteristics of IgE, in Allergy Unmasked: A New Understanding. Piscataway, NJ, Pharmacia Diagnostics 1979:20-5.
2. Kjellman NIM. Predictive value of high IgE levels in children. Acta Paediatr Scaand 1976;65:465.

271

PROGETTO APPROPRIATEZZA RICHIESTE ESAMI DI LABORATORIO

F. Antonelli¹, L. Masotti², L. Villani¹

¹U.O. Lab. Analisi Chimico Cliniche, Osp. Cecina Az. USL 6 LI

²U.O. Medicina Interna, Osp. Cecina, Az. USL 6 LI

Introduzione. Negli ultimi decenni si è assistito ad un incremento del ruolo del laboratorio all'interno dei percorsi diagnostici; ciò è strettamente legato al progresso tecnologico, a test dotati di maggiore accuratezza e come logica conseguenza, il costante incremento delle richieste.

Scopo. In un sistema a risorse limitate il percorso dell'appropriatezza la miglior applicazione.

Soprattutto nell'urgenza in cui il clinico deve assumere decisioni diagnostico-terapeutiche in tempi brevi, la proposizione di profili diagnostici può migliorare l'efficacia complessiva dell'analisi di laboratorio.

L'introduzione di profili semplici, correlati a specifiche patologie, concordate con i colleghi del Pronto Soccorso si ritiene possa servire per:

- 1) ridurre i tempi d'attesa per i pazienti.
- 2) migliorare l'appropriatezza della richiesta degli esami di laboratorio.
- 3) ridurre i costi.

Metodo. Sono stati individuati due profili d'area chirurgica e medica ai quali vengono se necessario per indirizzo diagnostico aggiunti altri profili.

Area medica Emocromo T Protombina aPTT Glicemia Creatinina Sodio /K

Area chirurgica Emocromo T. Protombina aPTT Glicemia Creatinina

Le patologie d'interesse scelte dal gruppo di lavoro per l'identificazione dei profili diagnostici più frequenti nel nostro Presidio: 1. Dolore Toracico 2. Insufficienza cardio respiratoria 3. Profilo bilio-pancreatico 4. Addome acuto 5. Malattia vascolare cerebrale/Neurologica 6 Politrauma Risultati. Nei primi 6 mesi di utilizzo dei nuovi profili diagnostici 12/07 -05/08

Abbiamo rilevato: una riduzione delle richieste (4982) rispetto allo stesso periodo del 2007.

Da 63415 esami richiesti a 58433 nonostante un incremento di pz. (+349)

Il tempo medio di refertazione (TaT) è diminuito di 10+/-15 passando dai 45-60'agli attuali 30'- 40'

Quindi una riduzione del 8.52% delle richieste nonostante un incremento del 5.3% di pz.

Conclusioni. Questo gruppo di lavoro ha identificato, condividendoli un gruppo d'esami di base per un profilo d'ingresso e una serie di quadri clinici d'urgenza scelti per l'elevata frequenza che sono stati confermati dall'uso quotidiano, con un discreto successo sia nella riduzione delle richieste che nella più rapida consegna del referto oltre che alla riduzione economica di quanto richiesto.

272

VALUTAZIONE DI ALCUNI PARAMETRI DELL'ESAME CHIMICO FISICO E MORFOLOGICO DELLE URINE PER L'INTERPRETAZIONE DELLE INFEZIONI BATTERICHE

R. Balducci¹, G. Volpones¹, M. Torsani¹, N. Nicoletti¹, G. Testa¹, M. Zappulla¹, M. Benzi¹, A. Berlini¹, D. Protti¹, B. Dell'Aquila¹, L. Santini²

¹U.O. Medicina di Laboratorio AUSL, Rimini

²Servizio Ricerca ed Innovazione AUSL, Rimini

Scopo del lavoro. Individuare valori decisionali significativi per infezioni batteriche urinarie per i seguenti parametri dell'esame completo delle urine: BATTERI, LEUCOCITI e NITRITI URINARI.

Materiali e metodi. Sono stati valutati circa 1000 campioni di pazienti ricoverati presso i reparti ospedalieri di Rimini, esclusi quelli pediatrici, non selezionati per sesso, età e patologia, nei primi mesi del 2008; le urine sono state raccolte con la modalità del mitto intermedio (urine primo mattino) e la preparazione per urinocoltura, con il sistema vacutainer ditta Greiner Bio-One, utilizzando due provette figlie per ciascun campione, una senza additivo per l'esame completo delle urine, una con additivo (acido borico) per l'urinocoltura.

I campioni sono stati processati su analizzatore automatico Aution Max Menarini e citofluorimetro UF100 Dasit.

I risultati e i cut-off dei parametri considerati sono stati confrontati con quelli dell'esame colturale, proveniente dalla stessa raccolta, con il metodo statistico della concordanza K.

Risultati. Batteriuria: con l'aumento dei valori cut-off la concordanza migliora pur non raggiungendo mai valori di K maggiori di 0,60 (concordanza sostanziale)

Sensibilità cut-off 2000 e 3000 (circa 90%)

Specificità (76%) cut-off 8000

Predittività negativa cut-off 2000 (VPN=90%)

I tre parametri combinati evidenziano una concordanza modesta (0,21)

VPN per i tre parametri combinati (VPN=100%)

Discussioni e Conclusioni. Non è stata fatta, volutamente, una revisione critica dei tre parametri tramite valutazione del citogramma e microscopia che avrebbe ridotto sicuramente i falsi positivi e i falsi negativi: è stata valutata la concordanza, in automazione, con l'esame colturale.

I risultati escluderebbero l'utilità dei tre parametri a scopo predittivo di infezione batterica delle vie urinarie. L'eccellente predittività negativa (VPN 100%) suggerisce di proporre un referto che riporti accanto ai risultati dei tre parametri i VPN ottenuti: questo limiterebbe ulteriori indagini con benefici per il paziente e l'Azienda sanitaria.

Bibliografia

1. Valverde S et al. Diagnostica delle infezioni delle vie urinarie mediante UF-100. Un anno di esperienza in un laboratorio generale. Riv Med Lab-JLM 2004;4.

A cura del Gruppo "Urine" Regione Emilia Romagna.

273

BIOLOGICAL EFFECTS OF DHT AND VALPROIC ACID TREATMENT ON ANDROGEN-DEPENDENT CELL LINE (LNCaP-SF)A. Valentini¹, C. Stellitano¹, P. De Vita¹, G. Federici², S. Bernardini¹¹Lab. Biologia Molecolare Clinica, Azienda Universitaria PTV- Tor Vergata, Roma²Lab. Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria PTV- Tor Vergata, Roma

Introduction. Prostate carcinoma (PCa) originates as an androgen-dependent hyperproliferation of the epithelial cells of the gland and it evolves in an androgen-independent, highly aggressive cancer for which no cure is available to date. Studies in the last two years have corroborated that the short chain fatty acid valproate (VPA) potently modulates the biology of prostate cancer cells by inducing differentiation, inhibiting proliferation and increasing apoptosis. Hence we studied the effect of VPA in combination with dihydrotestosterone (DHT) on the human prostate cancer cell line, LNCaP-SF.

Methods. LNCaP-SF is an androgen-deprivation induced human prostate cancer cell line, generated from the androgen-sensitive LNCaP cells, cultured in RPMI-1640 media containing charcoal-stripped FBS for a prolong period (more than four months). LNCaP-SF cells express considerably lower levels of androgen receptor than LNCaP cells and grow faster in androgen restricted condition in vitro.

Results and Discussion. In LNCaP-SF cells we observed that VPA was able to down-regulate both AR gene and protein expression, decreasing PSA levels, even in DHT presence. Moreover, LNCaP-SF proliferation was inhibited by VPA treatment of about 45% ,with the G1 phase arrest (70%) and induction of apoptosis (29%). In addition we observed that after 72 hours of VPA (2 mM) treatment, cells switched into oblong cells with long dendritic processes losing the rounded up phenotype.

The hormones homeostasis, hence steroids metabolism, in prostate is guaranteed by UGTs which glucuronidate DHT metabolites through an irreversible process. Because VPA is it same a substrate of UGTs, we investigate the effect of VPA on some UGTs expression. We found that VPA treatment modulates expression of such enzymes (UGT2B7, UGT2B11, UGT2B15) in LNCaP-SF cells, hence we cannot exclude a competitive effect of VPA in steroid catabolism. Although, VPA can reduce PSA and AR expression, decreasing cell proliferation rate, the action of VPA on prostate cancer should be further investigated. Therefore, in view of VPA ability in modulate hormone homeostasis of prostate cancer, LNCaP-SF cell line results a valuable tool for studying its molecular mechanisms.

274

LA RIMODULAZIONE DEI CENTRI PRELIEVI COME SNODO FONDAMENTALE PER LA REALIZZAZIONE DI UN LABORATORIO DI AREA VASTA: UN PIANO ED UNA PRIMA REALIZZAZIONEP. Billi¹, P. Maltoni¹, F. Bartolotti¹, F. Ravaglia², L. Vascotto³, V. Zanardi¹¹Laboratorio Analisi Ravenna sez. di Lugo²Servizio Infermieristico Ambulatoriale Distretto di Lugo, AUSL Ravenna³Laboratorio Analisi AUSL Cesena

Una delle fasi più importanti nella realizzazione di un Laboratorio di Area Vasta è la corretta gestione dei flussi operativi in entrata dai Punti Prelievi (PP) al Laboratorio Centrale (LC) ed in uscita dal LC ai PP. In entrata non vi sono da gestire solo i campioni biologici, ma anche tutte le informazioni accessorie: mediche ed amministrative (dati antropometrici, quesito clinico, ecc.) di accompagnamento ai campioni stessi che in definitiva sono la condizione (necessaria anche se non sufficiente) per aggiungere l'aggettivo "clinico" al Servizio di Patologia. In uscita, oltre al referto, diventano importanti tutte le informazioni ed i supporti che il laboratorio può fornire. In questo contesto i PP devono diventare parte sempre più attiva del Servizio e devono essere collegati, oltre che da una rete informatica, anche da una rete di volontà che concorrono a perseguire obiettivi condivisi. Nell'ambito della progettazione del Laboratorio di Area Vasta Romagna (AVR) il Gruppo di Lavoro sulla fase preanalitica (1) ha codificato le funzioni dei 90 PP e li ha classificati a seconda delle funzioni svolte, come verrà illustrato nel poster.

Il PP di Alfonsine (RA) è il primo ad avere iniziato questo nuovo tipo di attività in tutte le fasi previste. Già dal 2006 il personale di questa località aveva avviato la gestione preanalitica secondo procedure codificate (2)(3); da quest'anno (2008) ha iniziato a svolgere quella serie di funzioni amministrative citate sopra che in definitiva trasformano il PP in un vero e proprio settore del laboratorio, gestore completo delle fasi pre e post analitiche. La principale difficoltà incontrata in questa sperimentazione, che non ha comportato alcuna aggiunta di risorse umane, è stata quella della motivazione del personale. La presenza di Tecnici e Dirigenti del LC nel PP a condividerne l'attività è stata la chiave della riuscita dell'operazione. Nel Poster vengono descritte nel dettaglio le attività e la classificazione dei PP dell'AVR.

Bibliografia

1. Baldini L, Baldini E, Baldrati L, Bartolotti F, Berline A, Masi F, Matteucci M, Ortali R, Passerini C, Petraccone S, Ragazzini R, Vascotto L, Volpones G, Zanardi V (coord).
2. (CLSI-NCCLS H18-A3)
3. Zanardi V et al. *Bioch Clin* 2006;30(4):311.

275

DUE NUOVE FORMULE PER IL CALCOLO DEL FILTRATO GLOMERULARE BASATE SULLA BETA-TRACE PROTEIN: CONFRONTO CON LA MDRD

L. Caponi¹, E. Salomoni¹, P. Pietrini¹, C. Donadio²

¹U.O. Laboratorio di Analisi Cliniche Specializzate, Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Biologia Molecolare, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Pisa

²U.O. Nefrologia Universitaria, Dipartimento di Medicina Interna, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana

Già da tempo gli organismi internazionali di riferimento raccomandano l'uso di formule per la determinazione del filtrato glomerulare stimato (eGFR). Le formule finora proposte per determinare gli eGFR hanno dei limiti: spesso sono attendibili solo per alcuni gruppi di pazienti e soprattutto non sembrano sufficientemente sensibili per individuare lievi decrementi che consentano una diagnosi precoce di insufficienza renale. Uno studio recente (White CA, et Al. Clin Chem. 2007;53:1965-8) ha proposto l'utilizzo di due nuove formule che includono il dosaggio plasmatico della beta-Trace Protein (BTP), in un caso affiancata dall'urea (BTPurea) e nell'altro dalla creatinina (BTPcrea). Il nostro lavoro ha avuto come obiettivo la valutazione di queste nuove formule confrontandole con i dati forniti dalla MDRD.

Sono stati raccolti 92 campioni di plasma da un gruppo eterogeneo di pazienti afferenti alla U.O. di Nefrologia Universitaria, sui quali sono stati effettuati tra gli altri i dosaggi di BTP (con metodica nefelometrica), creatinina e urea (con metodica spettrofotometrica) nel plasma. Con i risultati ottenuti sono stati calcolati gli eGFR secondo le nuove formule proposte e secondo la MDRD, i quali sono stati sottoposti ad analisi statistica.

Dal confronto è emerso una buona correlazione tra i risultati delle due formule che usavano la BTP, per quanto dall'analisi di Bland Altman è emerso che l'eGFR secondo BTPcrea è solitamente superiore di quello calcolato secondo BTPurea e la differenza è tanto maggiore quanto più elevati sono i valori di filtrato. I valori restituiti dalla formula BTPcrea sono più elevati anche rispetto quelli ottenuti con MDRD, mentre il confronto tra i valori forniti da BTPurea e MDRD fanno osservare una maggiore vicinanza dei valori prodotti, specie per quantità di filtrato inferiori a 60 ml/min/1,73m². Va però tenuto presente che gli eGFR forniti dalla formula BTPurea risentono della dieta del soggetto che può influenzare il risultato dell'urea. Occorre pertanto studiare questo aspetto, che nella nostra casistica non abbiamo potuto prendere in considerazione.

In conclusione tali equazioni sembrano avere una buona performance, ma occorreranno ulteriori valutazioni su gruppi di popolazione selezionate.

276

T-cells PROTEOME ANALYSIS IN PATIENTS AFFECTED BY LYMPHOPROLIFERATIVE PATHOLOGIES

M. Borro¹, G. Gentile¹, M. Torre¹, O. De Luca¹, L. Aimati¹, A. Provenza¹, L. Lionetto¹, C. Cox², M. Simmaco¹

¹Dipartimento Scienze Biochimiche, UO Diagnostica Molecolare Avanzata (DiMA)

²UO Ematologia, II Facoltà di Medicina, Università La Sapienza, Roma

Introduction. B-lymphoproliferative diseases represent a wide range of neoplastic syndromes. T-lymphocytes play a key role in regulation of immunity and act in both stimulation and suppression of B-lymphocytes. Furthermore, T-cells from peripheral blood has been shown to be feasible sensors of gene expression modification in physiological and pathological conditions (1). Proteomic mapping of circulating T-cells derived from patients affected by different B-lymphoma might contribute to understand their functional role in these pathologies.

Methods. T cells were purified using the Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec Inc., USA). Proteins were analyzed by two dimensional electrophoresis using 18 cm IPG gel strip, pH 3-10 NL (Amersham) and 9-16% gradient polyacrylamide gels (18x20 cm). Gels were coomassie-stained and analyzed using the Bio-Rad PDQuest software. Protein spots of interest were identified by mass spectrometry. Unsupervised analysis of proteomic data was performed using the GeneSpring GX 7.3 software (Agilent Technologies).

Results. We report the preliminary results of a still in progress project which intends to study the T-cells proteomic profile in patients affected by different B-lymphoproliferative pathologies, such as Diffuse large B-cell lymphoma, Hodgkin's lymphoma, follicular B-lymphoma, Chronic Lymphoid Leukemia and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS). MGUS is not a lymphoma, but a condition in which a low or non-quantifiable level of a monoclonal paraprotein is detected in urine or blood (2). Anyway, it may be considered a pre-malignant condition, given the possibility of transformation into B-cell lymphoma or chronic lymphocytic leukemia. Eight proteins with modified expression compared with the control were identified in patients affected by B-cells diseases. Unsupervised analysis of proteomic data was performed, comprising expression data of T-lymphocytes proteome derived from a previous experiment including patients affected by non related pathologies. This analysis shows that, based on the protein expression pattern, the samples segregate according to the related pathology, highlighting the biosensor ability of T-cells.

References

1. Clin Exp Immunol 2007;150:494-501.
2. Br J Haematol 2003;121:749-57.

277

PLASMA CHONDROITIN SULFATE ISOMER DISACCHARIDES QUANTIFICATION BY ULTRA-RAPID SHORT-END-INJECTION CAPILLARY ELECTROPHORESIS

M. Sanna¹, A. Zinellu¹, S. Sotgia¹, B. Scanu¹, E. Pisanu¹, A.J. Lepedda², E. Zinellu², M. Formato², L. Deiana¹, C. Carru¹

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

²Dip. Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari, Università di Sassari

This report describes a new ultra rapid and simple CE method with UV detection for the analysis of unsaturated disaccharides obtained from enzymatic depolymerization of plasma chondroitin sulfate (CS) isomers. Disaccharides with different number and position of sulfate groups can be found, in different percentages, within the glycosaminoglycan (GAG) chains. GAG are implicated in important cellular events, such as differentiation, proliferation, migration and signalling and their functions are directly related to the sulfation pattern. Altered concentrations and different sulfation patterns are often encountered in pathological conditions. Treatment of CS/DS with chondroitinases ABC, AC, and/or B is essential to determine disaccharides composition. Since plasma GAG are found in trace amounts, enhanced sensitivity has been reached by derivatizing the sugar with 2-amioacridone (AMAC). The fluorotagget products can be separated by short-end-injection CE injecting the sample at the capillary end closest to the detector window. The migration time of Δ di-0S and Δ di-4S were 0.95 and 1.81 min respectively by using 30 mmol L⁻¹ sodium acetate buffer, pH 3.8, at 15°C and 30kV in an uncoated fused-silica capillary, 75 μ m ID and 30 cm total length. Quantification of total CS isomers was performed from a calibration curve obtained using plasma-purified CS. The calibration curve, calculated as total peak area of the two peaks ($n=817 \times 29$), showed a linear response over the tested concentration range (1-16 μ g) with a correlation coefficient $R^2=0.999$. These conditions gave a good reproducibility of both the migration time (CV%=0.21) and the peaks area (CV%= 2.1). Good reproducibility was also obtained in intra-assay and inter-assay test (CV=5.8% and CV=7.9% respectively). The results obtained by the new method have been compared with those obtained by the previous CE assay using Passing and Bablok regression and Bland-Altman tests. The statistical comparison indicated that the data obtained by the two methods were equivalent. This method that permits evaluation of CS levels and fine structure in plasma provides a good tool for clinical diagnosis in some diseases or for monitoring diseases progression.

278

GRADO DI SODDISFAZIONE DEGLI UTENTI DEL LABORATORIO DI ANALISI DEL DISTRETTO 47,ASL NA1, PARTECIPANTI AD UNO SCREENING DI VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI SINDROME METABOLICA

M. Di Palo², C. Caprio¹, L. Del Prete¹, P. Langella¹, T.R. Murciano², E. Sesto², F. Sgueglia¹, P. Improta¹, A. Mazzella¹

¹Lab. di Patologia Clinica e Microbiologia, D.S. 47 A.S.L. Napoli 1, Napoli

²Centro AntiDiabetico, D.S. 47 A.S.L. Napoli 1, Napoli

Obiettivo. L'obiettivo di questo studio è stato quello di conoscere il grado di soddisfazione degli Utenti del Distretto 47 partecipanti al programma di screening sulla Sindrome Metabolica (SM) al fine di individuare eventuali criticità nelle procedure poste in essere per la realizzazione del programma e porvi rimedio nella realizzazione di programmi futuri.

Materiali e metodi. Lo screening è stato effettuato in 6 giornate nell'arco di un mese. È stata esaminata una popolazione di 297 utenti; a tutti è stata consegnata una scheda, da compilare in anonimato. Sono state raccolte informazioni riguardanti la tipologia del campione: età, sesso, conoscenza della SM, desiderio di correggere un eventuale stile di vita errato; inoltre informazioni riguardanti il grado di soddisfazione, con suggerimenti in merito all'organizzazione dell'evento e del servizio. A tutti i soggetti che sono risultati affetti da SM è stata chiesta l'autorizzazione ad essere ricontattati a distanza di 6 mesi per un successivo controllo.

Risultati. Sono state distribuite 297 schede, 129 sono state restituite debitamente compilate, 5 sono risultate incomplete. I 297 utenti erano 204 femmine e 93 maschi. Il 37,9% era nostro abituale utente e il 21,77% dei partecipanti al progetto era a conoscenza di tale sindrome. Il grado di soddisfazione è stato misurato per informazioni, assistenza, accoglienza, professionalità, cortesia e soddisfazione per l'iniziativa in oggetto. Dall'indagine conoscitiva è risultato che circa il 90% dei partecipanti si è dichiarato soddisfatto, una percentuale oscillante dall'8 al 13% è risultata abbastanza soddisfatta.

Conclusioni. L'analisi ha dato un riscontro favorevole per tutte le variabili. Tutti gli affetti da SM (vecchi e nuovi utenti) hanno chiesto di essere ricontattati per i successivi controlli. La partecipazione femminile è stata più alta e questo dato si può giustificare sia con una maggiore attenzione delle donne riguardo alla prevenzione, sia per disponibilità di tempo. Il giudizio negativo emerso (2.5%) è risultato riferito alla scarsa pubblicizzazione dell'evento: he un'azione correttiva può consistere in una maggiore propaganda attraverso l'utilizzo dei mass media ed una più capillare informazione preventiva dei medici di famiglia.

279

STUDY ON URINARY EXOSOME COMPOSITION: SEARCH FOR NEW RCC BIOMARKERS

M. Pitto¹, R. Perego¹, F. Magni¹, P. Brambilla¹, G. Zanetti², S. Ferrero³, I. Cifola⁴, F. Raimondo¹

¹Dept. of Exp. Medicine, Univ. Milano-Bicocca, Monza, Italy

²Dept. of Urology, Hospital Maggiore IRCCS, Univ. Milano, Milano, Italy

³Dept. of Medicine Surgery and Dentistry, Pathological Anatomy, S. Paolo Hospital, Univ. of Milano, Milano, Italy

⁴Dept. of Biomedical Sciences and Technologies and CISI, Univ. of Milano, Milano, Italy

Exosomes are nanometer sized (50-100 nm) membrane vesicles released by most living cells, upon fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane. Secretion of exosomes by tumor cells is enhanced, suggesting their involvement in cancer progression. Urinary exosomes have been shown to derive from every epithelial cell type facing the urinary space, from the podocyte to the transitional epithelium of the bladder. For this reason they are considered an important source of urinary proteins and a promising starting material for biomarker discovery (1). Clear cell renal carcinomas (cRCC) is representing about 3% of all kidney cancers. No biomarkers for early diagnosis of cRCC in asymptomatic patients or for post-surgery monitoring are yet available.

We started the characterization of the exosomal fractions prepared from control and cRCC patients urines in order to look for differences in protein and/or lipid composition to be exploited as potential tumor marker.

Exosomes can be isolated from about 100 ml of urines, by ultracentrifugation (conventional method), or from only 6 ml urines using a nanomembrane ultrafiltration concentrator (rapid method). Protein composition was addressed by mono and 2D-EF, followed by CBB staining or WB with antibodies against specific membrane proteins. Lipid composition was assessed after extraction and partitioning: cholesterol and phospholipids were separated by TLC and visualized with anisaldehyde reagent.

Results show that the proteomic profile of urinary exosomes is simplified, with low content of albumin and uromodulin, which are the two most abundant proteins present in urine, of plasmatic and renal origin, respectively. Accordingly, minor urinary proteins resulted enriched. Several membrane proteins could be identified in exosomes after rapid method, and preliminary results show their differential amount in cRCC patient urines. Moreover, it was possible to quantify cholesterol and phospholipids after conventional exosome isolation from control urines.

In conclusion our work suggests that proteomics and lipidomics of urinary exosomes show potential for the identification of selective renal biomarkers.

Reference

1. Hoorn EJ et al. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology* 2005;10:283-90.

280

PROTEOMIC ANALYSIS OF HUMAN OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES SUBMITTED TO MAGNETIC FIELDS

D. Vannoni¹, E. Aceto², A. Cortelazzo², S. Carta³, R. Guerranti¹, E. Battisti⁴, R. Leoncini¹, S. Giglioni², P. Ferrata³, M. Fortina³, A. Albanese⁴

¹UOC Medicina di Laboratorio, AOUS Le Scotte, Siena

²Dip. Medicina Interna, Sc. Endocrino Metaboliche e Biochimica, Università, Siena

³Dip. Sc. Ortopedico-Riabilitative, Radiologiche e Otorinolaringoiatriche, Università, Siena

⁴Dip. Fisica, Università, Siena

Osteoarthritis is a chronic degenerative condition involving the joints. Numerous treatments, are geared towards relieving the pain and inflammation and amongst them, Magnetic Therapy, presents good results in decreasing pain symptoms. The present research has the aim to investigate, by a proteomic approach, the effects of magnetic fields (MF) on cultured chondrocytes, the only type of cell present in mature cartilage, involved in the control of cartilage integrity. We used two different kinds of MF: 1) traditional sinusoidal ELF MF (Extremely Low Frequency Magnetic Fields) (100Hz frequency); 2) the new TAMMEF system (Therapeutic Application of Musically Modulated Electromagnetic Fields) whose parameters (frequency, intensity and waveform) are modified in time; in fact TAMMEF is obtained through the music and generate MF as wide as possible (1).

Human chondrocytes were obtained from the femur head of three osteoarthritis adult patients and were cultured in our lab. till confluence (4-5 weeks). Before the first treatment the cells of each patient were divided randomly into four groups: A) exposed to TAMMEF, B) exposed to ELF MF, C) control group, not exposed to MF and maintained inside the incubator, SE) control group, sham exposed to MF and treated with ELF MF and TAMMEF fields, 30 min. for 15 days. After the exposure, whole-cell proteins were extracted, aliquots of 50 µg submitted to 2-DE, silver stained and analyzed using Image Master® 2D Platinum. With the software, composite gel images (synthetic gels) were created which contained only the main representative spots for each group, averaging the positions, shapes and optical densities of the matched spots. These gel were used for the statistical analysis (t-test). Many changes occurred in the proteomic profile after MF treatment with respect to the SE cells. In particular ELF treatment seems to be more invasive in that a significant change was observed in not less than 10 protein spot, while TAMMEF treatment, seems to be more conservative (only 5 proteins changed).

In the future, our studies will be directed to the identification of the proteins which significantly vary, by mass spectrometry to understand the metabolic response to the exposure.

Reference

1. Battisti et al. *The Environmentalist* 2007;27:441-5.

281

MORPHO-FUNCTIONAL MODIFICATION OF HUMAN NEUTROPHILS INDUCED BY AQUEOUS CIGARETTE SMOKE EXTRACT

B. Zappacosta¹, S. Persichilli², S. Papini¹, N. Maugeri³, J. Gervasoni², F. Iavarone², B. Giardina², P. De Sole²

¹*Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche Giovanni Paolo II, Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso*

²*Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

³*Cardio-Thoracic and Vascular, Department University Vita-Salute San Raffaele*

Background. Cigarette smoking plays an important role as cause of morbidity and mortality, involving respiratory, cardiovascular, digestive and reproductive systems.

Tobacco smoke contains a large number of molecules, some of which are proven carcinogens. The mechanisms by which these compounds are implicated in smoke-related diseases have extensively studied in recent years and, although not fully understood, PMNs seemed to play a crucial role.

In this paper we study the effects of an aqueous cigarette smoke extract (a-CSE) on PMN function, expressed as chemiluminescence activity, comparing the chemiluminescence results with the changes both in the expression of adhesion molecules and morphological aspects.

Methods. PMN isolated from healthy not smokers and serologically normal volunteers were incubated with a-CSE or KRP at 37°C for 30 minutes. The treated and untreated PMN were stimulated with zymosan and the chemiluminescence activity was measured. The suspension was placed in a microscope and the phagocytic process was observed. Furthermore, the up-regulation of CD18 (beta chain of leukocyte integrins) and the shedding of CD62L (L-selectin) were determined as surface markers of neutrophil activation.

Results. The results show that metabolic burst of a-CSE treated PMNs is significantly impaired, as shown by inhibition of total chemiluminescence and earlier chemiluminescence production. Furthermore, treated PMNs are unable to fully phagocytize zymosan particles; finally, significant changes of expression of membrane receptors (CD18, CD62) and mieloperoxidase are induced by cigarette smoke extract.

Conclusions. This study gives another piece of evidence for the harmful effects of cigarette smoke, in particular towards cell components.

282

THE BIOMEDICAL SCIENTIST IN ITALY: THE EVOLUTION OF A HEALTH PROFESSION

S. Lazzerini¹

¹*Lab. Chimica Clinica ed Ematologia, Nuovo Ospedale San Giovanni di Dio, Firenze*

Purpose of work. The Italian course of study for Biomedical Scientist (BS) has changed profoundly in the recent years, this operator has evolved from an "auxiliary" figure of the Italian laboratories to a responsible trader for acts within its competence, that plays with professional and technical autonomy. The competences and the responsibilities of the BS are: responsibility for the proper performance of analytical procedures, carry out the activity of analysis and research, participate to the quality control, check and verify the proper functioning of the equipment used (taking care of routine maintenance), control organizational and managerial processes and finally compete for the educational improvement.

Materials and Methods. The BS has two kind of title, professional "Biomedical Laboratory Technologist" and academic "Doctor in Techniques of Biomedical Laboratory", but this goal was reached only recently, in the 2004. The course of study in the universities, the 1st cycle university degree of Bologna Declaration (BD), has a duration of 3 years (y), provides 180 credits (CFU) and the degree is "Laurea" (L).

The 2nd cycle of BD has a duration of 2 y (120 CFU) and the degree is "Laurea Magistrale" (LM).

The courses are present, academic year 2008-2009, in many Italian universities: 36 (L) and 17 (LM); students 1151 (L) and 379 (LM).

The 3rd cycle of BD has a minimum duration of 3 y and the degree is "Dottorato di Ricerca" (these courses are not present in the Italian universities yet).

Further university studies are: the "Diploma di Specializzazione" (DS2) and the "Diploma Master Universitario" of 1st and 2nd level (MU1/MU2); there are not courses for DS2 in the Italian universities for the moment. DS2 is a 2nd level specialization degree, it has a variable duration (2-6 y and 120-360 CFU) and it provides the title "Specialist in ..." (field); MU1 and MU2 have a duration of 1 year (60 CFU) and they provide the titles "University Master 1st/2nd level".

Debate and Conclusions. The BS has a very complex training, which makes it an important player in the National Health Service, the BS with its training and tools at its disposal is a key partner to the clinics in the diagnosis of pathological states, to monitor their evolution and for prognostic purposes.

283

OSMOLALITÀ CALCOLATA O OSMOLALITÀ MISURATA? LA NOSTRA ESPERIENZAP. Bidone¹, V. Bianchi¹, C. Arfini¹¹Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

L'osmolalità è legata al numero di particelle osmoticamente attive disciolte nell'acqua e determina la pressione osmotica esercitata sulla membrana cellulare. Scopo di questo lavoro è valutare se gli algoritmi proposti in letteratura per il calcolo dell'osmolalità possano in qualche modo sostituirla la misura diretta.

Materiali e Metodi. Campioni: 102 sieri e 94 urine spot di pazienti ricoverati

Strumentazione: ADVIA 2400 (Siemens) per Na, glucosio ed urea

Osmometro 3320 (Advanced Instruments) per osmolalità

Osmolalità calcolata: sono stati valutati tre algoritmi:

$Osm = 2Na(\text{mmoli/L}) + \text{glucosio}(\text{mmoli/L}) + \text{urea}(\text{mmoli/L}) = (ALG1)$

$Osm = 1,86Na(\text{mmoli/L}) + \text{glucosio}(\text{mmoli/L}) + \text{urea}(\text{mmoli/L}) + 9 = (ALG2)$

$Osm = [1,86Na(\text{mmoli/L}) + \text{glucosio}(\text{mmoli/L}) + \text{urea}(\text{mmoli/L})] \times 1,09 = (ALG3)$

Risultati. Ipotizzando il valore misurato come valore reale dell'osmolalità, le rette di regressione lineare e gli indici di correlazione rispetto ai valori calcolati con gli algoritmi proposti sono

URINA

(ALG1) vs Misurato: $Y = 0,7938x + 17,661$; $R^2 = 0,9295$

(ALG2) vs Misurato: $Y = 0,7783x + 20,691$; $R^2 = 0,9345$

(ALG3) vs Misurato: $Y = 0,9487x + 36,90$; $R^2 = 0,8269$

SIERO

(ALG1) vs Misurato: $Y = 0,6954x + 92,016$; $R^2 = 0,6979$

(ALG2) vs Misurato: $Y = 0,5915x + 112,56$; $R^2 = 0,5304$

(ALG3) vs Misurato: $Y = 0,711x + 92,79$; $R^2 = 0,6843$

Considerazioni e Conclusioni. Dalla nostra sperimentazione risulta evidente che

- per le urine esiste una buona correlazione tra valore calcolato e misurato qualunque algoritmo si utilizzi. ALG1 e ALG2 danno risultati abbastanza simili, nel senso che entrambi sembrano sottodosare l'osmolalità, ALG3 dà risultati più simili ai valori misurati ma la correlazione nel complesso è leggermente inferiore.

- per il siero la correlazione è scarsa, qualsiasi algoritmo proposto si usi. I valori calcolati sono sempre inferiori a quelli misurati (da -39% a -42%). Questo potrebbe essere spiegato con il fatto che nel siero, rispetto all'urina, molti altri analiti, non considerati nel calcolo, siano osmoticamente attivi.

Pertanto l'utilizzo del solo algoritmo è abbastanza limitativo e non vicaria, soprattutto per il siero, la misura diretta dell'osmolalità.

Bibliografia

www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003463.htm

www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003609.htm

284

ANTIGENE FECALE DI HELICOBACTER PYLORI: IMPIEGO DI UN TEST RAPIDO CON ANTICORPI POLICLONALIG. Ciarrocchi¹, M. D'Anzeo¹, V. Murri¹, R. Pergolini¹, G. Rondello¹¹S.O.D. Lab. analisi, Sez. Sierologia, A.O. Ospedali Riuniti, Ancona

Introduzione. I test non invasivi per la dimostrazione di *Helicobacter pylori* sono ben considerati nel Maastricht III Consensus Report (2005). Essi comprendono il 13C Urea Breath Test (UBT); i test sierologici di elevata accuratezza; ricerca di antigene in campioni fecali.

Scopo. Ricerca di *Helicobacter pylori* fecale con un test rapido basato su anticorpi policlonali.

Materiali e Metodi. La ricerca di antigene di *Helicobacter pylori* è stata eseguita mediante il kit Helori Fast (Eurospital) su 90 campioni fecali appartenenti a pazienti adulti e pediatrici con variegato quadro clinico: altamente suggestivo per infezione da *Helicobacter pylori*; ovvero con generici sintomi dispeptici. Un kit elisa classico (Helori - Eurospital) è stato utilizzato per confronto. Un test rapido con anticorpi monoclonali (HpSA STAT - Meridian) è stato impiegato per confermare 45 campioni, risultati positivi (n=24), negativi (n=16) o discrepanti (n=5).

Risultati. Nel confronto sui 90 campioni tra Helori Fast e Helori elisa, 24 risultarono fortemente positivi con entrambi i test. 15/24 pazienti mostravano una clinica compatibile con infezione da *Helicobacter pylori*; in 9/24 i dati clinici non erano noti. I campioni concordemente negativi furono 57. La concordanza totale tra i test risultò del 95,5%. Dei restanti 9 campioni, cinque risultarono indeterminati ad entrambi i test e quattro mostravano discrepanze minori, in assenza di indizi clinici evidenti. Il test HpSA STAT confermò tutti i 24 campioni positivi e i 16 negativi esaminati, mentre i cinque campioni border-line risultarono negativi.

Conclusioni. L'impiego di un test rapido basato su anticorpi policlonali appare in via preliminare un affidabile presidio diagnostico in casi di forte presenza di antigene fecale. Nei casi di debole positività, è consigliabile un approfondimento clinico e diagnostico con test quantitativo di riferimento.

Bibliografia

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *GUT* 2007;56:772-81.

285

CATENA DI CUSTODIA PER VIOLENZA SESSUALE SU MINORI OLTRE I 13 ANNI E SU ADULTIG. Magri¹, P. Calcagno¹, C. Pareti¹, C. Vignale¹¹Osp. Civile di Imperia ASL1

I protocolli operativi assumono un valore sempre crescente sui comportamenti corali degli operatori sanitari. L'abuso sessuale costituisce una grave violazione dei diritti e della dignità di una persona. L'importanza della corretta gestione dei materiali biologici, assume rilievo sempre più crescente, soprattutto in ambito giudiziario, dove l'incongruità dei dati o della custodia può costituire elemento invalidante del materiale analizzato.

Epidemiologia. Definire la violenza sessuale, i maltrattamenti, non è cosa semplice infatti non esiste una misura univoca di incidenza o prevalenza.

Scopo della presente catena di custodia è quella di definire le modalità di conduzione delle procedure che gestiscono il percorso per le violenze su minori oltre i 13 anni e su adulti di ambo i sessi.

Le modalità per la corretta gestione dei materiali campionati evita l'invalidazione del materiale analizzato.

La scheda, costituisce un percorso in cui tutti i passaggi sono codificati e tracciati chiaramente. La scheda serve a ricordare le sequenze procedurali, deve essere considerata ed utilizzata come un promemoria operativo in cui si indicano le operazioni in successione. Si inizia con gli indumenti: se i sanitari reputano che un indumento, possa essere importante per fornire informazioni e dettagli sull'aggressione, deve essere raccolto in una busta di carta e congelato a -20°C , dopo aver sigillato e firmato la busta. Successivamente dovrà essere specificato il numero di vetrini effettuati dal Ginecologo e il numero di tamponi secchi per l'eventuale tipizzazione genica dell'aggressore. Il consenso del paziente è fondamentale per l'assunzione di responsabilità. La catena di custodia vera e propria riveste una notevole importanza: infatti la richiesta di analisi ai vari settori con la firma di tutti coloro che richiedono, eseguono, trasportano e ricevono i campioni biologici costituisce una prova inoppugnabile atta a correlare quel paziente con quelle determinazioni analitiche. Le norme ISO e quelle dell'accreditamento sono categoriche: la tracciabilità del campionamento deve essere garantita e in sede legale questo procedimento si traduce in un'evidenza che il campione prelevato appartenga inequivocabilmente ad una determinata persona, senza possibilità di scambio.

286

BURST RESPIRATORIO DEI LEUCOCITI NEL SANGUE PERIFERICO (PMNs): MISURA DELLA CL MEDIANTE LUMINOMETRO A PIASTRA (VICTOR)C. Rossi¹, P. De Sole¹¹Ist. di Chimica e Biochimica Clinica, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Obiettivi. La misura dell'attività in chemiluminescenza (CL) è un test largamente utilizzato per monitorare il burst respiratorio delle cellule fagocitiche sia isolate che direttamente su sangue intero. Comunemente, la CL viene misurata in cuvette contenenti circa 10^3 PMNs, negli ultimi 35 anni sono stati pubblicati migliaia di lavori che riportano i valori di CL ottenuti con luminometri molto sensibili, mentre l'uso di luminometri con micropiastre è ancora molto limitato. In questo lavoro abbiamo effettuato misure di CL di PMNs con un lettore di piastre Victor (Perkin Elmer), al fine di valutare l'effetto di possibili fattori strumentali quali:

- altezza della sonda ottica,
- larghezza dell'apertura della sonda ottica,
- diametro del pozzetto.

Materiali e metodi. Le prove sono state effettuate su leucociti neutrofili separati da sangue intero, in presenza di Luminol e di Zymosan.

Risultati.

- 1) La sensibilità del Victor risulta 100 volte inferiore al luminometro e quindi non è possibile misurare la CL dei PMN direttamente su sangue intero;
- 2) Prove di cross talk mostrano nelle piastre a 96 pozzetti valori di interferenza inferiori al 2%;
- 3) La distanza della sonda ottica (5-18 mm) non mostra alcun effetto sui valori di CL;
- 4) Non ci sono effetti sulla CL dei PMN per concentrazioni di emazie $< 2.0 \times 10^6$ /pozzetto
- 5) L'attività specifica è costante in un largo range di PMNs e la concentrazione ottimale sembra essere $20-150 \times 10^3$ /pozzetto.
- 6) La risposta di CL risulta direttamente proporzionale al rapporto: apertura sonda/diametro pozzetto.

Discussione. Il risultato degli esperimenti effettuati indica che l'emissione di CL è funzione lineare del numero di PMNs e del rapporto tra l'apertura della sonda di emissione e il diametro del pozzetto secondo la seguente formula: $\text{CPS} = K \times (\text{PMNs/pozzetto}) \times (\text{Apertura della sonda di emissione/Diametro del pozzetto})$ con $K = 0.0033 \pm 0.018 \times \text{PMN}^{-1}$

Bibliografia

Lojeck A, Ciz M. Luminometric analysis of the neutrophils respiratory burst in microtitre plates *Epidem Mikrob Immunologie* 2001;50(4):160-4.