

Riassunti sessioni scientifiche sponsorizzate

Codice Abstract	Titoli Sessioni scientifiche sponsorizzate
• SS1 - SS2	La strumentazione per emogasanalisi dell'isola al network comunicativo
• SS3 - SS5	Dosaggio del paratormone: le aspettative del clinico e le risposte del laboratorio
• SS6 - SS7	La qualità dei dati analitici: un punto centrale negli obiettivi di un laboratorio moderno
• SS8 - SS9	Attualità diagnostiche in elettroforesi
• SS10	La farmacogenomica nella pratica clinica: il contributo della medicina di laboratorio
• SS11 - SS13	Il rischio cardiovascolare nelle sindromi metaboliche: il ruolo delle sd-LDL
• SS14 - SS15	Il ruolo del laboratorio clinico nella diagnosi e nella terapia degli inibitori acquisiti dei fattori della coagulazione
• SS16 - SS17	Nuovi traguardi in elettroforesi capillare
• SS18 - SS19	Valutazione multicentrica di un sistema immunochimico "user friendly"
• SS20 - SS22	Ematologia: la qualità dietro il referto
• SS23 - SS24	Consolidamento analitico dei dosaggi cardiaci e di infettivologia
• SS25	Citometria a flusso in laboratorio: qualità, automazione, screening
• SS26 - SS27	Problematiche metodologiche in immunometria automatizzata
• SS28 - SS29	Nuovi markers diagnostici in autoimmunità ed allergologia
• SS30 - SS33	La moderna automazione: ottimizzazione dei processi e flessibilità nelle soluzioni

SS1

LA CONNETTIVITA' E IL WIRELESS

L. Grazioli

A. De Mori, Milano

L'introduzione delle nuove tecnologie informatiche come la connettività Wireless ha notevolmente esteso le possibilità di comunicazioni tra apparecchiature. L'integrazione di Emogasanalizzatore, Software di gestione e LIS ha trasformato l'esecuzione del test in un processo di lavoro standardizzato che coinvolge la fase pre-analitica, analitica e post-analitica. La corretta azione terapeutica sul paziente deriva da un corretta esecuzione dell'intero processo, il sistema informatico standardizza la fase pre-analitica, nella quale avvengono la maggior parte degli errori, permettendo l'associazione "sicura" Paziente - Campione - Operatore direttamente all'atto del prelievo; successivamente il sistema è in grado di garantire l'archiviazione del dato e la corretta trasmissione, anche wireless, al LIS/HIS indipendentemente dall'apparecchiatura sul quale l'analisi viene effettuata. La logica di progetto della dislocazione della stazione POCT passa quindi da quella delle "isole analitiche" a quella di un sistema integrato dove è possibile scindere il concetto di "utilizzatore" del servizio da quello di "proprietario" dell'apparecchio pur garantendo la massima sicurezza, qualità e disponibilità del dato analitico. Sarà quindi possibile contenere, ove logisticamente conveniente, il numero degli apparecchiature senza creare disagio agli utilizzatori che non dispongono dell'apparecchio in reparto.

SS2

IL CONTRIBUTO DEL LABORATORIO NELLA VERIFICA DI QUALITÀ IN UN SISTEMA DI EMOGASANALIZZATORI DISLOCATI IN REPARTO; IL SUPPORTO DEL SERVIZIO WDC

G. Bellomo

Laboratorio Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità, Novara

Il supporto del Laboratorio per l'Assicurazione di Qualità di un sistema di emogasanalizzatori ha come principale leva la pianificazione, implementazione e verifica dell'esecuzione dei Controlli di Qualità. Si pone l'accento sull'importanza del monitoraggio della qualità analitica attraverso i QC, come strumento per una corretta valutazione di tutti i parametri operando a più livelli, al fine di garantire l'affidabilità del risultato. La disponibilità di intervalli di verifica corretti, ed elaborazioni attraverso grafici Levey-Jennings o Regole di Westgard facilita una corretta interpretazione dei risultati e consente al Laboratorio, qualora venga accertata una non conformità, di procedere attraverso opportune azioni correttive.

Un contributo in questo senso proviene dall'esperien-

za in adesione ad un servizio denominato WDC, in grado di elaborare i risultati ottenuti in un confronto con gruppi omogenei di riferimento e fornire suggerimenti di intervento al supervisore, tracciando in modo preciso attraverso tavole di controllo lo stato complessivo del sistema, e anticipando qualora richiesto la necessità di azioni, volte ad assicurare il funzionamento ottimale dello strumento.

SS3

L'IPERPARATIROIDISMO PRIMITIVO

P. Limone

A.S.O. Ordine Mauriziano, Torino

L'iperparatiroidismo primitivo è un disordine relativamente comune, con un'incidenza di 1/500 - 1/1000. E' la terza malattia endocrina in ordine di frequenza dopo diabete ed ipertiroidismo.

Nell'80% dei casi è provocato da un singolo adenoma delle paratiroidi; raro è il carcinoma (< 1% dei casi). L'iperplasia delle quattro paratiroidi si osserva nel 15-20% dei casi, sia in forma sporadica, sia nell'ambito dell'Adenomatosi Endocrina Multipla di tipo sia I sia II. La manifestazione principale dell'iperparatiroidismo primitivo è l'ipercalcemia, dovuta ad un aumentato riassorbimento osseo, renale ed intestinale. Le manifestazioni cliniche sono rappresentate da calcolosi renale, sintomi neurologici e digestivi, osteoporosi. La diagnosi si basa sul riscontro di elevati valori elevati valori di PTH associati ad ipercalcemia. Per quanto riguarda la diagnostica per immagini gli esami fondamentali sono l'ecografia e la scintigrafia con Sesta-MIBI.

La terapia è chirurgica per i casi con calcemia superiore a 11 mg/dl o complicanze legate all'ipercalcemia. Nei casi lievi si può effettuare un follow-up clinico.

SS4

IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO

M. Marangella

ASO Ordine Mauriziano, Torino

L'iperparatiroidismo secondario (S-HPT) è la più frequente complicanza della sindrome uremica. La patogenesi di questa anomalia deriva dalla ritenzione fosforica che si associa alla riduzione della funzione renale, e alla ridotta sintesi renale di calcitriolo (1,25 (OH) 2 vit D3). Questi eventi occorrono abbastanza precocemente nella progressione della insufficienza renale (IRC). Tuttavia, il maggior determinante della sintesi e secrezione di PTH, è la calcemia ionizzata, che agisce sulla ghiandola attraverso un sensore, il calcium sensing receptor (CaR), il quale comunica alla cellula paratiroidea i livelli di calcio extracellulare, inibendola in caso di aumento. Fra le concause è da

ricordate la resistenza dell'osso all'azione stessa del PTH.

Un cero grado i S-HPT è tollerabile in corso di IRC, e le linee guida nazionali ed americane K-DOKI, fissano come ottimali, valori di PTH compresi fra 150-300 pg/mL, nei pazienti in emodialisi, un poco più bassi nei pazienti con IRC medio-avanzata.

La terapia del S-HPT è uno dei maggiori problemi del nefrologo, e l'armamentario terapeutico disponibile è abbastanza ricco, anche se a volte molto costoso.

La prevenzione terapia di S-HPT si fonda infatti sul controllo della fosforemia, che si attua con dieta e con chelanti del fosforo, capaci di indurre una riduzione del suo assorbimento intestinale. I metabolici attivi della vitamina D, che alcuni preferiscono definire attivatori dei recettori della vitamina D (VDRa), comprendono sia il calcitriolo, che il paracalcitolo. Molto recente è la introduzione di agonisti del CaR, definiti calciomimetici, fra cui il cinacalcet. Si tratta di farmaci i quali, legandosi al CaR, riproducono su questo gli effetti dell'aumento del calcio extracellulare, senza indurre ipercalcemia.

L'uso combinato di questi farmaci consente un buon controllo del S-HPT, ma rappresenta un costo aggiuntivo non indifferente nel management del paziente uremico.

Nella ottimizzazione della terapia i controlli biochimici costituiscono un passaggio centrale, e fra questi il dosaggio del PTH è un momento insostituibile. Le raccomandazioni delle linee guida che stabiliscono precisi intervalli per il PTH, presuppongono che si debba disporre di dosaggi affidabili, in cui sia ben chiaro che cosa si dosa, e con valori di riferimento confrontabili. Si tratta di problematiche di profondo impatto sia sul piano clinico che su quello economico gestionale.

SS5

PARATHYROID HORMONE MEASUREMENTS: ANALYTICAL TROUBLESHOOTING

S. Santini

U.O.C. Laboratorio Analisi Cliniche, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza San Giovanni Rotondo (FG)

Parathyroid hormone (PTH), a single-chain 84-amino acid polypeptide, is thought to circulate in the blood as a mixture of whole molecule [PTH (1-84)] and N- and C-terminal (C-PTH) fragments. In patients with intact renal function, the non-(1-84) PTH reportedly accounts for 21% of PTH (1-84) in hypercalcemia and 10% in hypocalcemia. C-PTH fragments accumulate in renal failure up to 40-50% of total PTH and may be implicated in the PTH resistance observed in these patients. It is not known whether these fragments can mimic the biological effects of PTH (1-84) or, in contrast, react with distinct receptors. The major large C-PTH fragment with partially preserved N-terminal structure is PTH (7-84), often considered to be the likely cross-reacting peptide in "intact PTH" (I-PTH)

assays. The biological activity of this fragment is not definitively known. Measurement of circulating biologically active PTH is crucial for the differential diagnosis of hypercalcemia and hypocalcemia and in the diagnosis and management of primary hyperparathyroidism, vitamin D deficiency, and renal osteodystrophy. The prospect of multiple full-length and C-terminal species of the hormone with potentially independent regulation and biological properties indicates an interesting new episode in PTH research.

In most laboratories, I-PTH assays from several manufacturers are routinely performed. These assays use antibodies against amino acids 15-34 and 50-65 of the PTH molecule and, thus, also measure C-PTH fragments with preserved N-terminal structure [such as PTH (7-84)]. A newly available (Bio-Intact) PTH assay measures only the "whole" molecule (residues 1-84) because the antibodies used recognize epitopes in the regions of amino acids 1-5 and 50-65. Recently, a new molecular form of PTH, with structural integrity of the PTH (1-4) region and a modified PTH (15-20) region, has been identified by HPLC in primary and secondary hyperparathyroidism. In fact, this newly discovered form of PTH appears to be immunoreactive and detectable by the whole-PTH assay but not by the intact-PTH assay.

Hence, PTH measurement still involves many problems, considering the molecular heterogeneity and the different specificity of the available immunometric methods. Furthermore, a number of preanalytical factors can affect the PTH measurement: the intraindividual biological variability (pulsatile secretion, circadian rhythm) and the interindividual variability (sex, age, genetics factors) while the antibody interference (anti-PTH autoantibodies and heterophilic antibodies) and the calibration differences existing among the commercially available assays are factors which can affect the analytical variability.

The differences in PTH values among immunoassays, observed in both uremic, primary HPT patients and in healthy individuals, could be attributable to the different calibration procedures in addition to the presence of PTH fragments. It would be useful for manufacturers to reduce the systemic variability among methods by use of a more standardized method of calibration and use of antibodies that recognize the only biologically active PTH molecule.

SS6

LA QUALITA' NEL LABORATORIO DI URGENZA

G. Melzi d'Eril¹, R. Boccalini²

¹*Dipartimento di Medicina, Chirurgia ed Odontoiatria, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Laboratorio di Analisi, Ospedale San Paolo, Milano*

Il reparto di Pronto Soccorso/Emergenza-Urgenza (PS/EU) rappresenta il più usuale accesso al sistema ospedaliero. Dati di una decina di anni fa riportano l'e-

sistenza di 5194 ospedali in funzione negli Stati Uniti con 95 milioni circa di accessi al PS/EU e una percentuale di conseguenti ricoveri del 15%. Da allora il ricorso da parte della popolazione al PS/EU è continuato ad aumentare e tutti i servizi che interagiscono con questo reparto sono tenuti ad ottimizzare il loro prodotto mantenendo alto il livello della qualità e contribuendo alla risoluzione dei problemi collegati all'urgenza. Tra questi, il Laboratorio di Analisi svolge un ruolo di primo piano tanto che già nel 1965 si discuteva riguardo al sistema per migliorarne l'impatto in un'area di PS/EU (1). Da allora molto è cambiato. Tra l'altro, solo per citare alcuni aspetti impensabili a quel tempo, oggi usufruiamo di sistemi informatici ad elevate prestazioni così come di autoanalizzatori raffinati che hanno consentito il consolidamento dell'attività analitica. Anche il miglioramento dei sistemi di trasporto e l'automazione della preparazione e distribuzione dei campioni ha permesso di mantenere il Laboratorio all'altezza delle richieste da parte di tutto il Sistema Sanitario.

Il miglioramento della qualità a tutti i livelli passa attraverso il riconoscimento degli errori che si compiono nelle varie fasi dell'attività del Laboratorio. Tra questi, i più numerosi si riferiscono alla fase preanalitica potendo raggiungere l'80% del totale (2,3). Nel Laboratorio di urgenza poi, l'incidenza degli errori legati sempre alla fase preanalitica rappresenta il 2% circa dell'attività complessiva che vi si svolge (4) e la presenza di emolisi è registrata come il più frequente motivo di interferenza (5). Il riconoscimento degli errori preanalitici e quindi le procedure per prevenirli sono alla base della strategia del miglioramento della qualità del Laboratorio. In particolare, non è difficile immaginare come la loro maggiore riduzione possa derivare dal miglioramento della qualità nella fase di raccolta dei campioni (6).

Uno degli aspetti più appariscenti del Laboratorio di urgenza e dal quale i clinici e le organizzazioni di accreditamento ne giudicano l'efficienza è il tempo di esecuzione degli esami (TAT) (7-9). Un recente lavoro riporta come il monitoraggio continuo di tale parametro (riferito alla potassiemia) e la conoscenza dei risultati da parte degli operatori ne ha consentito una significativa riduzione andando quindi maggiormente incontro alle attese dei clinici che avevano fatto la richiesta (10). Un aspetto di cui non si tiene sempre conto nel valutare il TAT è che il personale del Laboratorio impiega da 6 mesi ad un anno a impadronirsi di nuove tecniche e di nuove strumentazioni per cui la riduzione del TAT in tali casi risulta graduale e solo lentamente va a regime (11).

Nella fase analitica l'errore più frequente è la presenza di interferenze o la mancanza di specificità analitica del metodo per il dosaggio seguito da una insufficiente performance analitica in termini di accuratezza o di precisione (o di entrambe).

Infine, nella fase postanalitica è la mancata o ritardata comunicazione dei risultati al medico a rappresentare la più frequente causa di errore.

La soluzione ai problemi dell'urgenza non può essere unica ed universale e comunque ogni tentativo di modifica richiede tempo e può solo nascere da uno studio orientato al miglioramento della qualità in generale. La cooperazione interdipartimentale per il miglioramento della qualità, che include la ricerca di una più alta accuratezza nella fase analitica e la certezza della riproducibilità nella attività pre e postanalitica, è fondamentale per evitare da parte del Laboratorio il rifiuto di campioni o l'invio di risultati fuorvianti che possono influenzare negativamente l'outcome del paziente. Riguardo alla fase preanalitica, l'educazione continua rivolta al personale appartenente a tutti i livelli del PS/EU deve essere garantita perché esso svolge un ruolo chiave in questa fase. Tra gli argomenti da aggiornare periodicamente vi è la appropriata scelta del test e il corretto momento del prelievo, la scelta della provetta seguendo procedure scritte che ne indichino anche la gestione e, infine, un audit periodico dei tempi di esecuzione e degli errori compiuti.

Bibliografia

1. NH Reiber. Survey of emergency-room usage gives guidelines for improvement. *Hosp Topics* 1965;43:69-73.
2. M Plebani, P Carraro. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem* 1997;43:1348-51.
3. V Wiwanitkit. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002: 1994 certified clinical laboratory, a 6-month monitoring. *BMC Clin Pathol* 2001;1:5.
4. A Romero, M Munoz, JR Ramos, A Campos, G Ramirez. Identification of preanalytical mistakes in the stat section of the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:974-5.
5. P carraro, G Servidio, M Plebani. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem* 2000;46:306-7.
6. D Blumenthal. The errors of our ways (editorial). *Clin Chem* 1997;43:1305.
7. P Valenstein. Laboratory turnaround time. *Am J Clin Pathol* 1996;105:676-88.
8. Standards for Pathology and Clinical Laboratory Service. Oakbrook Terrace, Ill: Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organization; 1998.
9. Laboratory Accreditation Program Hematology Checklist. Northfield, Ill: College of American Pathologists; 2001.
10. DA Novis, MK Walsh, JC Dale, PJ Howanitz. Continuous monitoring of Stat and routine outlier turnaround time. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:621-6.
11. YW Huang, WH Chen, HJ Wu, HY Chien, TY Lin, HH Ghiang, TM Huang, CL Lin. Learning curve of a new hospital laboratory. The monitoring of computer-generated turnaround time of laboratory tests in an emergency department. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1373-8.

SS7

QUALITÀ ED EFFICIENZA: BINOMIO INSCINDIBILE IN UN MODERNO LABORATORIO

B. Milanese

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Desenzano del Garda (BS)

Nella progettazione di un moderno servizio di Medicina di Laboratorio, non possiamo non prendere in considerazione le "sfide" che il responsabile del Servizio deve tenere in ampia considerazione per potersi confrontare in modo autorevole con il proprio Management.

Nella mia realtà operativa ho evidenziato 5 aspetti che mi sono stati da guida e che continuano tuttora ad esserlo:

- Migliorare i livelli di servizio
- Ottimizzazione del lavoro
- Assicurare la Qualità dei risultati
- Contenimento dei costi
- Appropriatezza Diagnostica

Tali aspetti sono diventati gli "obiettivi" che ho perseguito in ogni mia scelta operativa; inoltre al fine di ottenere un continuo monitoraggio dell'evoluzione del progetto ho utilizzato la Balanced Score Card (BSC) che è uno strumento che in ogni istante mi consente di tenere sotto stretto controllo tutte le variabili che possono andare ad inficiare il risultato finale.

La BSC, attraverso la metodologia del Metaplan, ha posto in evidenza 4 MacroAree di lavoro in sintonia con le Sfide-Obiettivi che mi ero proposto di raggiungere:

- Area della Formazione
- Area dei Processi
- Area Economica
- Area della Soddisfazione del Cliente

Quindi al fine di poter gestire al meglio le Sfide che comporta la Direzione di un Moderno Laboratorio occorre abbinare alla imprescindibile Qualità del dato analitico offerto un servizio efficiente ed efficace.

SS8

LA SINTESI INTRATECALE: OLTRE LA REAZIONE OLIGOCLONALE IgG

E. Ciusani

U.O. Analisi Cliniche, Istituto Neurologico C. Besta, Milano

Nei processi infiammatori a carico del sistema nervoso centrale (SNC) è elemento diagnostico fondamentale è la presenza della cosiddetta "reazione oligoclonale" nel liquor. Dal punto di vista analitico, il miglior approccio metodologico per evidenziarla consiste nella isoelettrofocalizzazione (IEF) delle immunoglobuline del liquor in gel di agarosio seguita da immunoblotting per la rivelazione delle IgG. L'ultimo "Consensus Report" europeo, tra le altre raccomanda-

zioni per una corretta e sensibile ricerca della reazione oligoclonale, indica la possibilità di utilizzare per l'immunodetezione, anche anticorpi diretti contro le catene κ e λ delle immunoglobuline. Questo metodo avrebbe il vantaggio di ridurre il "rumore di fondo" aumentando la capacità del test di evidenziare reazioni oligoclonali di modesta entità.

Nel nostro laboratorio, il liquor viene routinariamente analizzato mediante IEF seguito da blotting su PVDF ed immunorivelazione delle IgG con utilizzo di un substrato chemiluminescente. Su un selezionato gruppo di campioni, abbiamo anche valutato l'utilizzo di anticorpi anti catene κ e λ in aggiunta alla determinazione routinaria. Dopo la separazione elettroforetica, le proteine venivano trasferite su due o tre membrane di PVDF (multiple blotting) che venivano poi cimentate con anticorpi anti IgG, catene κ o catene λ direttamente coniugati con perossidasi.

I dati ottenuti mostrano che, in alcuni casi di difficile interpretazione, l'evidenziazione delle catene κ o λ può essere di aiuto per determinazione della reazione oligoclonale.

SS9

COMPONENTI MONOCLONALI E AGAROSIO: IERI, OGGI...E DOMANI? CONSIDERAZIONI SU ALCUNI CASI ESEGUITI CON SAS 3/4

M.T. Muratore

Lab. Analisi, Ospedale Belcolle, Viterbo

Il rilievo di una componente monoclonale all'elettroforesi è un dato che non va mai sottovalutato, anzi va segnalato, data l'importanza che può assumere.

Da uno studio di Robert A. Kyle del 2002 (1) effettuato su pazienti afferenti alla Mayo Clinic è risultato che il 2% di persone sopra a 50 anni presentano una gammapatia di incerto significato (MGUS), ma non è raro trovare componenti monoclonali in pazienti al di sotto dei 50 anni.

In uno studio del 2005 S. Vincent Rajkumar (2) sostiene che l'1% per anno delle MGUS e il 10-20% per anno di Smoldering Multiple Myeloma (SMM) progredisce verso un'emopatia maligna.

Sebbene sia descritto un più alto rischio di progressione verso il Mieloma Multiplo (MM) per componenti di una maggiore entità, anche piccolissime componenti monoclonali possono evolvere verso un'emopatia maligna e possono talvolta essere messe in relazione con un'amiloidosi o con un mieloma micromolecolare. Appare pertanto importante non "perdere" anche piccole componenti monoclonali; per questo è fondamentale l'alta risoluzione del mezzo usato per l'esecuzione dell'elettroforesi. e l'agarosio permette ad un occhio attento anche se poco allenato il riconoscimento anche di componenti monoclonali di lievissima entità. Già nella "Raccomandazione ufficiale della Commissione SIBioC "sull'elettroforesi delle sieropro-

teine del 1994 si enfatizzava l'importanza di questo dato e veniva fatto riferimento ad un lavoro di Aguzzi, Jayakar, Merlini e Petrini che dimostrava come l'agarosio fosse più sensibile dell'acetato nell'evidenziare le componenti monoclonali; poi è storia comune: tutti i laboratori che sono passati dall'acetato all'agarosio hanno potuto verificarlo.

Per quanto riguarda le tipizzazioni delle componenti monoclonali l'immunofissazione eseguita in gel d'agarosio è ancora il test di riferimento.

Verranno illustrati alcuni casi di elettroforesi sieriche con componenti monoclonali e alcune immunofissazioni di campioni di siero e urine.

Come da un caso di ipogamma si sia potuta scoprire un'amiloidosi, come una modestissima componente monoclonale in gamma abbia fatto da richiamo e abbia permesso di scoprire un'altra lievissima bandina in beta 1 che nascondeva un importante micromolecolare, come talvolta i pettinini depositori possano trattenere le Ig M monoclonali e ingannare sull'entità della componente monoclonale, come un'elettroforesi assolutamente normale possa nascondere, ahimè, un micromolecolare che ha già causato lesioni osteolitiche.

Bibliografia

A Long - Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. Robert A. Kyle e al., New England Journal of Medicine, vol 346:564-569, Feb. 21, 2002

MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Update on pathogenesis, natural History, and management. S. Vincent Rajkumar, Hematology 2005, pag. 340-345

SS10

AMPLICHIP CYP450: ANALISI DEL GENOTIPO PER GLI ISOENZIMI 2D6 E 2C19 NELLA TERAPIA DEL DOLORE

D. Basso

Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova

Il termine farmacogenetica comprende per convenzione lo studio di polimorfismi o mutazioni genetiche somatiche o della linea germinale, capaci di predire la risposta al trattamento farmacologico. La farmacogenetica comprende lo studio di polimorfismi di geni che codificano trasportatori o recettori di farmaci e enzimi che catalizzano la trasformazione metabolica dei farmaci. E' stato stimato che polimorfismi di geni che codificano per le proteine coinvolte nel catabolismo e nell'attivazione dei farmaci sono responsabili fino al 95% della variabilità delle risposte farmacologiche che si osservano nei singoli pazienti. Quando la variante di un gene è associata ad una diversa risposta allo stesso trattamento farmacologico la sua identificazione potrebbe indirizzare la scelta terapeutica e posologica più appropriata. Numerosi studi hanno dimostrato

l'utilità clinica dello studio farmacogenetico di geni che codificano proteine coinvolte nel metabolismo di farmaci antipsicotici ed antidepressivi. In questo ambito la farmacogenetica consente di predire da un lato l'efficacia del trattamento e dall'altro lo sviluppo di reazioni avverse ai farmaci. La base fisiopatologia di tale fenomeno, che consente di spiegare almeno in parte la variabilità interindividuale della risposta ai farmaci antidepressivi ed antipsicotici, è rappresentata dal fatto che varianti alleliche di geni che codificano enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci, determinano la sintesi di varianti proteiche con attività enzimatica elevata, bassa o nulla. Questo presupposto è la base genetica di un fenomeno noto da molti anni in farmacologia che riconosce nella popolazione due principali categorie fenotipiche di soggetti che rispondono in maniera completamente diversa al trattamento farmacologico: i metabolizzatori lenti ed i metabolizzatori rapidi ed eventualmente i metabolizzatori ultrarapidi. E' noto che il 5-10% della popolazione caucasica è costituita da metabolizzatori lenti dei farmaci antidepressivi che, dopo somministrazione di dosi standard del farmaco, possono sviluppare gravi reazioni tossiche. I principali polimorfismi genetici che possono influenzare significativamente l'attività di enzimi che catalizzano reazioni di attivazione di profarmaci a farmaci attivi o di inattivazione di farmaci attivi in farmaci inattivi, sono quelli a carico dei geni che codificano i citocromi P450 (CYP) 2C9, 2C19 e 2D6. La famiglia CYP2C consiste di almeno 4 isoforme (2C8, 2C9, 2C18 e 2C19), codificate da altrettanti geni colocalizzati sul cromosoma 10. Il CYP2C9, il più abbondante fra le isoforme del citocromo P450, catalizza la biotrasformazione di numerosissimi farmaci ed è polimorfo. Studi "in vitro" hanno dimostrato che variazioni della sequenza aminoacidica possono influenzare significativamente sia l'attività enzimatica sia l'affinità per il substrato portando all'abolizione dell'attività enzimatica, ad una sua riduzione o ad un suo incremento. Al tutt'oggi sono conosciute tre varianti alleliche (CYP2C9*1, CYP2C9*2 e CYP2C9*3), che codificano proteine con diversa attività enzimatica. Anche il CYP2C19 presenta varianti alleliche che codificano enzimi con diversa attività catalitica. Il CYP2D6, seppure espresso a bassi livelli rispetto agli altri citocromi P450, svolge un ruolo estremamente importante nel metabolismo di molti farmaci che agiscono a livello del sistema nervoso centrale e dell'apparato cardiovascolare. Il gene è localizzato sul cromosoma 22 e l'attività può essere pressoché assente in alcuni individui o elevatissima nei cosiddetti metabolizzatori ultrarapidi. Il gene CYP2D6 è estremamente polimorfo (sono conosciute almeno 80 varianti alleliche), anche se sono solo quattro gli alleli principali (CYP2D*3, CYP2D*4, CYP2D*5 e CYP2D*6) che rendono conto del 90-95% dei metabolizzatori lenti. Duplicazioni del gene sono responsabili del fenotipo dei metabolizzatori ultrarapidi, stimati pari a 5.7 milioni di soggetti in Italia. Oltre agli studi "in vitro" che hanno dimostrato come alcune varianti alleliche dei citocromi P450 2C9, 2C19

e 2D6 sono correlate a variazioni dell'attività enzimatica, alcuni studi "in vivo" hanno documentato una correlazione fra i livelli circolanti di farmaci antipsicotici o antidepressivi e il genotipo dei citocromi P450. In particolare a parità di dose somministrata i livelli circolanti di risperidone, un antipsicotico che agisce antagonizzando selettivamente i recettori 5HT₂ della serotonina e D₂ della dopamina, risultavano estremamente ridotti nei soggetti portatori di una duplicazione del gene CYP2D6 (metabolizzatori ultrarapidi) e viceversa estremamente elevati nei soggetti portatori di due alleli mutati (metabolizzatori lenti). Varianti alleliche del CYP2D6 si associano anche a variazioni dei livelli circolanti di fluoxetina, uno degli inibitori del reuptake della serotonina maggiormente prescritto nel trattamento della depressione.

Nonostante i notevoli progressi compiuti dalla ricerca farmacologica nelle ultime decadi, la maggior parte degli studi clinici evidenzia una mancata risposta al trattamento nel 40-60% dei soggetti affetti da depressione, anche se è stata fatta loro una diagnosi corretta ed è stata somministrata una terapia farmacologica adeguata. Questo aspetto assume una particolare rilevanza in quanto le terapie comunemente impiegate (compresi i recenti SSRI, SNRI e i classici triciclici) presentano una latenza di risposta di circa due-tre settimane. E' solo dopo questo periodo di tempo che, nel caso di mancata risposta, lo specialista prende in considerazione interventi correttivi quali l'incremento della posologia o l'impiego di un farmaco diverso. Come sopra descritto, polimorfismi di geni che codificano enzimi (CYP) che catalizzano le reazioni di biotrasformazione dei farmaci antidepressivi, possono essere responsabili dello sviluppo di gravi reazioni tossiche o della mancata risposta al trattamento.

Il concetto di ereditarietà poligenica nella risposta farmacologica sottolinea l'importanza di un approccio farmacogenetico non minimalista, che considera più geni come responsabili della variabilità nella risposta individuale ai farmaci. La molteplicità degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci antidepressivi oltre che la spiccata variabilità allelica dei singoli geni rende di scarsa utilità l'analisi dei singoli polimorfismi del singolo locus genico. Di sicura utilità clinica risulterebbe invece lo studio combinato delle varianti alleliche di più geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci antidepressivi. Questa necessità è tanto più evidente qualora si consideri che negli studi di associazione tra genotipo e risultato terapeutico ad oggi pubblicati, emergono dati che talora sono in contrasto tra loro, determinando un aumento dell'incertezza nell'identificazione di marcatori genetici predittivi di risposta e l'impossibilità di trasferire tali conoscenze in prodotti al servizio del paziente.

Lo studio combinato delle varianti alleliche di più geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci antidepressivi risultava fino a qualche anno fa di difficile applicazione poiché ogni polimorfismo doveva essere analizzato mediante un singolo test, impegnativo soprattutto per la durata di esecuzione. E' di recentissima introduzio-

ne in commercio un microarray (AmpliChip CYP450, Roche Diagnostics, Basilea, Svizzera) che consente di valutare in un singolo passaggio saggio i polimorfismi più frequenti del CYP2D6 (n=29) e del CYP2C19 (n=2).

SS11

LA SINDROME METABOLICA: ASPETTI CLINICI

G.F. Pagano

P.O. di Medicina Interna dell'Università di Torino

La diagnosi di Sindrome Metabolica viene posta a livello internazionale seguendo le linee guida del National Cholesterol Education Program – ATP III (JAMA 2001), che possono così essere riassunte:

• Presenza di almeno 3 dei seguenti determinanti del rischio

1. Obesità addominale (>102 cm nei M, >88 cm nelle D)
2. Trigliceridemia (>150 mg/dl)
3. HDL colesterolo (<40 mg/dl nei M, <50 mg/dl nelle D)
4. Pressione arteriosa ($\geq 130/ \geq 85$ mm Hg)
5. Glicemia plasmatica a digiuno (≥ 110 mg/dl)

A questa definizione sono seguite precisazioni correttive, che non hanno di fatto modificato la sostanza del problema.

Dal punto di vista fisiopatologico la Sindrome Metabolica può essere considerata una condizione di prediabete di tipo 2, ricuperando i meccanismi patogenetici proposti in questa patologia: alterazione di alcuni segnali neuroormonali a livello del sistema nervoso centrale, con riduzione dell'attività simpatica e della capacità ossidativa dei FFA nel muscolo (aumento del contenuto miocellulare di lipidi e conseguente insulino-resistenza). La beta cellula insulare deve perciò produrre più insulina per compensare l'insulino-resistenza, ma l'iperinsulinemia cronica riduce l'ossidazione dei FFA e dei trigliceridi, interferendo nei processi di trasporto e forforilazione intracellulare. Effetti lipotossici si svolgerebbero anche a livello della beta cellula insulare, sottoposta ad iperlavoro dall'insulino-resistenza. A questa visione tradizionale si aggiungono i meccanismi dipendenti dalla periferia (cellula adiposa) ed in particolare alcuni meccanismi infiammatori citochine-dipendenti.

Dal punto di vista della storia naturale, la Sindrome Metabolica si caratterizza per avere un rischio aumentato di circa 3 volte di sviluppare il diabete di tipo 2 nei successivi 7 anni (San Antonio Heart Study) e di oltre 2 volte di sviluppare la malattia cardiovascolare ischemica (Studio di Kuopio in Finlandia e NHANES III americano). Questi dati sottolineano l'importanza di ricercare la Sindrome nella popolazione apparentemente sana per identificare i soggetti a rischio diabete e malattia cardiovascolare ed instaurare in questi soggetti gli interventi preventivi (al momento prevalentemente di tipo comportamentale).

Si deve infine ricordare la recente presa di posizione dell'American Diabetes Association (ADA) e

dell'European Association for the Study of Diabetes (EASD) relativa alla accettazione della Sindrome Metabolica come entità clinica autonoma (Diabetologia, 2005): il documento congiunto sottolinea che ciò non è sicuro e che l'impiego della definizione della Sindrome Metabolica dovrebbe essere essenzialmente clinico e non fisiopatologico. Su questa linea c'è un accordo generale.

SS12

IL RUOLO DELLE LDL PICCOLE E DENSE

M. Cassader

Dipartimento di Medicina Interna, Università di Torino

Le lipoproteine a bassa densità (LDL) non rappresentano una classe lipoproteica omogenea. Utilizzando particolari tecniche di laboratorio è infatti possibile evidenziare almeno quattro maggiori sottoclassi, diverse per densità, dimensioni e composizione, con una grande variabilità individuale.

Nella popolazione generale i soggetti che presentano una preponderanza di particelle più piccole e dense (pattern B) hanno un incremento del rischio relativo di sviluppare malattie cardiovascolari di almeno tre volte rispetto a coloro che hanno una preponderanza di particelle più larghe (pattern A).

Le particelle LDL piccole e dense ($d < 25.7\text{nm}$) tendono a generarsi nei soggetti con Sindrome Metabolica che presentano una aumentata produzione di trigliceridi (Tg) nelle particelle VLDL di più grosse dimensioni. Questi Tg possono essere scambiati tramite la CETP con esteri del colesterolo provenienti da particelle LDL di più grosse dimensioni, che caricandosi in modo abnorme di Tg sono suscettibili all'attacco della Lipasi Epatica, che le trasforma in LDL piccole e dense.

Queste particelle impoverite di esteri del colesterolo, sono particolarmente aterogene, rispetto alle LDL di maggiori dimensioni, perché vengono meno catturate dal recettore della Apolipoproteina B e dirottate verso gli "Scavenger Receptors", in virtù di dimensioni ridotte penetrano più facilmente nello spazio sub-intimale della parete arteriosa, hanno maggior affinità per i proteoglicani e sono più suscettibili alla ossidazione, con tutte le conseguenze del caso.

Anche se i livelli circolanti di colesterolo nella SM sono di solito di poco aumentati, uno stato di insulino-resistenza che favorisce la attività della lipasi epatica, porta al rimodellamento delle particelle LDL in senso aterogeno con meccanismo descritto.

Risulta quindi molto importante disporre di metodiche biochimiche semplificate per poter determinare la concentrazione delle LDL piccole e dense nei soggetti a particolare rischio aterogeno, senza dover ricorrere a metodiche complesse come quelle di ultracentrifugazione o di elettroforesi, non applicabili a grosse casistiche.

SS13

METODICHE DI DETERMINAZIONE DELLE LDL PICCOLE E DENSE

R. Gambino

Dipartimento di Medicina Interna, Università di Torino

Le lipoproteine a bassa densità (LDL) sono particelle estremamente eterogenee per dimensione, densità e composizione lipoproteica. Le LDL più piccole e più dense, definite "small dense LDL" (sdLDL) sono le più aterogene ed il loro fenotipo è significativamente associato allo sviluppo della malattia coronarica. In questa sessione sono illustrati i differenti metodi per la determinazione delle sdLDL. L'ultracentrifugazione, la risonanza magnetica nucleare (NMR) e l'elettroforesi su gradiente di poliacrilamide (GGE) sono metodi che di solito sono utilizzati per quantificare le sdLDL. Tuttavia questi metodi sono troppo complessi per essere applicati per scopi clinici di routine.

In particolare, nel caso dell'ultracentrifugazione, occorre isolare le sdLDL in modo isopicnico od impiegando un gradiente di densità che permette di isolare le lipoproteine nel range di densità 1.044-1.063 g/ml.

La metodica NMR utilizza il segnale emesso dai gruppi metilici dei lipidi associati alle lipoproteine. Questo metodo permette di ottenere numerose sottoclassi delle lipoproteine plasmatiche, incluse le sdLDL.

L'elettroforesi su gradiente di poliacrilamide permette di calcolare il valore del diametro della particella LDL estrapolandolo da una curva di taratura eseguita con standards di diametro conosciuto. Le LDL si classificano in pattern A o pattern B a seconda che il loro diametro sia superiore o inferiore a 25 nm.

Recentemente è stata messa a punto una determinazione delle sdLDL che si basa su una procedura di precipitazione chimica. La precipitazione è eseguita con una soluzione di magnesio ed eparina opportunamente mescolate a precise concentrazioni. La concentrazione di magnesio ed eparina permette di precipitare la maggior parte delle lipoproteine che contengono apo B (VLDL, IDL, LDL di pattern A) e di lasciare in soluzione le sdLDL e le HDL. Il precipitato è estratto per filtrazione. Sul filtrato si determina la concentrazione del colesterolo legato alle sdLDL mediante un metodo omogeneo completamente automatizzato. Questa metodica è applicabile ad usi clinici di routine e permette di processare numerosi campioni contemporaneamente.

SS14

BIOCHIMICA DEGLI INIBITORI DEI FATTORI DELLA COAGULAZIONE

G.L. Salvagno

Sezione di Chimica e Biochimica clinica, Dipartimento di Scienze Morfologiche-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Verona

La presenza di autoanticorpi diretti contro alcuni fattori della coagulazione determina una profonda alterazione nei meccanismi fisiologici dell'emostasi, volti a garantire l'integrità del distretto ematico in caso di trauma endoteliale. Questi anticorpi inattivano i fattori influenzando una serie di funzioni omeostatiche necessarie per un'emostasi efficace (1). Attivazione, amplificazione della cascata coagulativa e consolidamento del coagulo, sono determinati dal bilancio tra l'attività di proteasi specifiche e dei rispettivi inibitori allosterici ed enzimatici. Un'anomalia in un punto qualsiasi dell'emostasi può generare stati patologici, caratterizzati da emorragie o trombosi dei vasi a seconda che vi sia un'insufficiente od eccessiva risposta al danno endoteliale. La presenza di anticorpi diretti contro alcuni fattori della coagulazione rappresenta un'importante causa di alterazione della normale funzione coagulativa, generando condizioni di particolare gravità clinica.

Lo sviluppo di autoanticorpi coinvolge molti fattori della coagulazione, quali il fattore VIII (FVIII) (2-3), il fattore IX (FIX) (4), fattore V (FV) (5-6) ed il fattore II (FII) (7). In letteratura sono stati anche segnalati anticorpi diretti contro il sistema della Proteina C e Proteina S (8) ed il fattore di von Willebrand (VWF) (9-10). Complessivamente l'incidenza degli anticorpi diretti verso i fattori della coagulazione è bassa (2). Il FVIII rappresenta il bersaglio più coinvolto dallo sviluppo di autoanticorpi, con una incidenza variabile tra 0.2 ed 1 per milione di abitanti (11). Le caratteristiche immunologiche degli anticorpi, la cinetica di azione, gli epitopi riconosciuti, rappresentano una sfida importante per il laboratorio di coagulazione nella corretta diagnosi e monitoraggio della terapia. In modo particolare, negli ultimi anni sono aumentate le conoscenze relative all'eziopatogenesi ed alla fisiopatologia degli anticorpi verso il FVIII, giustificando alcuni importanti aspetti della risposta immunitaria. L'emofilia è una malattia ereditaria recessiva caratterizzata da una grave insufficienza nella coagulazione del sangue imputabile a livelli ridotti o assenti di FVIII (emofilia A), o FIX (emofilia B). Il FVIII è una proteina complessa che consta di diversi domini (A1-A2-B-A3-C1-C2) e circola nel plasma stabilizzata dal VWF. Nei pazienti con emofilia A è di particolare interesse valutare l'efficacia della terapia sostitutiva con concentrati del FVIII della coagulazione. Classicamente, la terapia consiste nella somministrazione di concentrati di FVIII. In commercio vi sono diversi preparati differenti per modalità di preparazione e contenuto in VWF. Lo sviluppo di anticorpi contro il FVIII è probabilmente la complicanza più grave della terapia sostitutiva nei pazienti emofilici.

L'incidenza dei pazienti che sviluppano anticorpi è compresa fra il 5-7% a seconda dei diversi studi, ma può raggiungere il 30 % negli emofilici gravi (12-3). È stato riportato in letteratura che il VWF contenuto in alcuni concentrati commerciali riduce l'incidenza dello sviluppo d'anticorpi. I plasmi dei pazienti con l'inibitore, hanno una reattività diversa in funzione dei concentrati commerciali di FVIII utilizzati ed una diversa capacità di generare trombina. Per meglio caratterizzare l'influenza dei diversi profili anticorpali, sono stati analizzati 11 plasmi di soggetti emofilici tipo A, con espressione di inibitore a vario titolo (compreso fra 2.7-6135 MIU). Per ciascun paziente è stata valutata la mappa degli epitopi degli anticorpi secondo il metodo descritto da Astermark (14). Degli 11 pazienti soltanto uno presentava anticorpi diretti principalmente contro il dominio A2 del FVIII mentre gli altri soggetti avevano anticorpi diretti contro i domini C1 e C2, siti di legame con il VWF. Per chiarire l'influenza della degradazione del FVIII da parte dei diversi profili anticorpali sono stati utilizzati 4 tipi diversi di preparati commerciali di FVIII. Due concentrati di FVIII contenenti diversa concentrazione di VWF, un concentrato di FVIII purificato con anticorpi monoclonali (tracce di VWF) e un FVIII ricombinante (senza VWF). La reattività dei diversi anticorpi è stata determinata in un sistema di generazione di trombina (15). È stato utile definire la reattività anticorpale in funzione della capacità del plasma del paziente di generare trombina dopo somministrazione dei diversi preparati commerciali di FVIII. Il titolo anticorpale per inibire il FVIII ricombinante è risultato significativamente inferiore (mediana = 0.64; intervallo = 0.46-1.03), rispetto al valore ottenuto con il FVIII purificato con anticorpi monoclonali (mediana = 0.98; intervallo = 0.59-1.48). Il valore del titolo anticorpale con i preparati di FVIII con VWF ha evidenziato un valore maggiore (mediana = 1.14; intervallo = 0.5-2.07 e mediana = 1.12; intervallo = 0.74-2.33). Una differenza statisticamente significativa ($p < 0.01$) è stata osservata fra i tre diversi tipi di preparati commerciali di FVIII. Ciò sembra dipendere in larga misura dalla presenza e dalla concentrazione del VWF. Infatti è stato dimostrato che il VWF protegge il FVIII dalla degradazione dell'anticorpo mascherando alcuni siti riconosciuti dall'anticorpo (16-8). Nell'ottica di questi risultati, risulta quindi essenziale lo studio della cinetica di azione degli anticorpi e la conoscenza dell'epitopo specifico, al fine di valutare in modo appropriato le caratteristiche degli inibitori (19).

Bibliografia

1. Manzato F, Lippi G, Franchini M, Guidi GC. Fisiopatologia della coagulazione: nuove acquisizioni. *Biochimica Clinica*, 2004; 28: 4
2. Lollar P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J Thromb Haemost.* 2004; 2:1082-95
3. Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Gungor T, Krackhardt B, Kornhuber B. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in

haemophiliacs. *Lancet*. 1992; 339:594-8

4. Lollar P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part II. Fibrinogen, prothrombin, thrombin, factor V, factor XI, factor XII, factor XIII, the protein C system and von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*. 2005; 3:1385-91

5. Caers J, Reekmans A, Jochmans K, Naegels S, Mana F, Urbain D, Reynaert H. Factor V inhibitor after injection of human thrombin (tissucol) into a bleeding peptic ulcer. *Endoscopy*. 2003; 35:542-4

6. Knobl P, Lechner K. Acquired factor V inhibitors. *Baillieres Clin Haematol*. 1998 ;11:305-18.

7. Sie P, Bezeaud A, Dupouy D, Archipoff G, Freyssinet JM, Dugoujon JM, Serre G, Guillin MC, Boneu B. An acquired antithrombin autoantibody directed toward the catalytic center of the enzyme. *J Clin Invest*. 1991;88:290-6.

8. Mitchell CA, Rowell JA, Hau L, Young JP, Salem HH. A fatal thrombotic disorder associated with an acquired inhibitor of protein C. *N Engl J Med*. 1987 Dec 24;317:1638-42

9. Simone JV, Cornet JA, Abildgaard CF. Acquired von Willebrand's syndrome in systemic lupus erythematosus. *Blood*. 1968; 31: 806-12.

10. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, Budde U, van Genderen PJ, Mohri H, Meyer D, Rodeghiero F, Sadler JE; Subcommittee on von Willebrand Factor. Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. *Thromb Haemost*. 2000; 84: 345-9.

11. Cohen AJ, Kessler CM. Acquired inhibitors. *Baillieres Clin Haematol*. 1996 ;9: 331-54.

12. Astermark J, Berntorp E. Malmo International Brother Study (MIBS): an international survey of brother pairs with haemophilia. *Vox Sang*. 1999;77:80-2

13. Addiego J, Kasper C, Abildgaard C, Hilgartner M, Lusher J, Glader B, Aledort L. Frequency of inhibitor development in haemophiliacs treated with low-purity factor VIII. *Lancet* 1993;342:462-4.

14. Astermark J, Voorberg J, Lenk H, DiMichele D, Shapiro A, Tjonfjord G, et al. Impact of inhibitor epitope profile on the neutralizing effect against plasma-derived and recombinant factor VIII concentrates in vitro. *Haemophilia* 2003; 9: 567-72.

15. Turecek PL, Varadi K, Keil B, Negrier C, Berntorp E, Astermark J, Bordet JC, Morfini M, Linari S, Schwarz HP. Factor VIII inhibitor-bypassing agents act by inducing thrombin generation and can be monitored by a thrombin generation assay. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:16-22.

16. Berntorp E. Variation in factor VIII inhibitor reactivity with different commercial factor VIII preparations: is it of clinical importance? *Haematologica*. 2003;88

17. Berntorp E, Ekman M, Gunnarsson M, Nilsson IM. Variation in factor VIII inhibitor reactivity with different commercial factor VIII preparations. *Haemophilia* 1996;2:95-9

18. Astermark J, Voorberg J, Lenk H, DiMichele D, Shapiro A, Tjonfjord G, Berntorp E. Impact of inhibitor epitope profile on the neutralizing effect against plasma-derived and recombinant factor VIII concentra-

tes in vitro. *Haemophilia*. 2003; 9:567-72

19. Lavigne-Lissalde G, Schved JF, Granier C, Villard S. Anti-factor VIII antibodies: a 2005 update. *Thromb Haemost*. 2005; 94: 760-9.

SS15

APPROCCIO LABORATORISTICO ALL'EMOFILIA ACQUISITA

G. Lippi

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

Introduzione. Il progresso tecnologico ed il susseguirsi delle scoperte scientifiche nel corso degli ultimi anni hanno consentito di caratterizzare in dettaglio i complessi meccanismi che regolano il delicato bilancio emostatico. A seguito di un danno endoteliale, dopo l'attivazione dell'emostasi primaria, si sviluppa l'emostasi secondaria, nota anche come "coagulazione". La cascata coagulativa coinvolge una serie di conversioni enzimatiche sequenziali, coordinate e calcio-dipendenti, di proenzimi nelle rispettive proteasi seriniche, culminanti nell'attivazione della protrombina a trombina, nella conversione del fibrinogeno a fibrina e, in ultimo, nella formazione di un coagulo stabilizzato dall'intervento del fattore XIII (FXIII). Poiché le singole reazioni sono catalizzate da un enzima e poiché la molecola di un enzima può catalizzare la formazione di un numero molto grande di molecole, si comprende facilmente l'enorme potenziale amplificatorio efficacemente descritto dal suddetto modello a cascata. Attivazione, amplificazione della cascata e stabilizzazione del coagulo sono rigorosamente modulate dal bilancio tra l'attività di proteasi specifiche e dei rispettivi inibitori allosterici ed enzimatici, il cui corretto funzionamento è essenziale. Ogni anomalia che coinvolge questo delicato meccanismo rappresenta una potenziale causa di emorragie clinicamente importanti. Il successo della cascata coagulativa dipende quindi in larga misura dall'ottima rappresentazione che il modello fa dei due test tradizionali di primo livello (o screening), il tempo di protrombina (PT) e il tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT), i quali raffigurano la via estrinseca e la via intrinseca, rispettivamente. Anomalie dei fattori della coagulazione devono quindi essere sempre sospettate in presenza di allungamenti di uno o entrambi i test.

La comparsa di un'emorragia improvvisa, acuta e generalizzata, può essere conseguenza di molte condizioni patologiche, congenite o acquisite. La prevalenza delle sindromi emorragiche d'origine genetica è inversamente correlata all'età del paziente, a differenza di quelle acquisite. In pratica, alterazioni genetiche della coagulazione che sottendono sindromi emorragiche gravi appaiono clinicamente in giovane età e dipendono strettamente dal numero di possibili eventi scatenanti (traumi infantili, ferite, contusioni, interventi chirurgici minori o odontoiatrici). La probabilità di com-

parsa di sindromi emorragiche congenite severe in età avanzata è minore rispetto alle forme congenite, ma è comunque importante a causa della gravità clinica. A questa "regola" possono fare eccezione condizioni clinicamente meno severe, quali lievi difetti di fattore di von Willebrand (VWF) o difetti congeniti di fattori della coagulazione meno importanti. In queste particolari condizioni cliniche, solo fattori scatenanti di forte peso (interventi chirurgici maggiori, politraumatismo) giustificerebbero la comparsa di gravi e talora fatali emorragie.

Pertanto, la comparsa di una sindrome emorragica grave in un soggetto adulto deve sempre far sospettare, accanto ad improbabili ma non impossibili cause congenite, alterazioni acquisite del sistema emostatico. Una grave sindrome emorragica improvvisa, generalizzata ed irrefrenabile è solitamente segno caratteristico di una coagulopatia intravascolare disseminata (CID); tuttavia, la diagnosi di CID in questa situazione clinica non è univoca, poiché altre patologie, sinteticamente riassunte in Tabella I, possono manifestarsi con caratteristiche cliniche simili o addirittura più gravi.

Il laboratorio nei disturbi emorragici

Gli esami di laboratorio per la valutazione delle anomalie emostatiche hanno il compito di indirizzare primariamente verso la fase responsabile del difetto. Chiaramente, non è necessario estendere lo screening a tutti, ma solo a pazienti con anamnesi emorragica suggestiva e familiari di pazienti con deficit ereditari ad impronta emorragica. Gli esami di screening sono anche utili al fine di predire il rischio emorragico di pazienti soggetti asintomatici, sottoposti a procedimenti invasivi poiché la diatesi emorragica di pazienti con forme lievi può esordire solo in seguito a traumi o interventi chirurgici. E' necessario ribadire che l'approccio diagnostico presuppone sempre la raccolta di una approfondita anamnesi emorragia familiare e personale. Poste queste premesse, l'approccio laboratoristico prevede una distinzione tra esami di screening, analisi definite di secondo livello o di approfondimento diagnostico, destinate a pazienti con diatesi emorragica molto sospetta, anamnesi familiare suggestiva e risultato degli esami di screening nella norma. Gli esami di screening si suddividono a loro volta tra quelli che esplorano l'emostasi primaria o fase vasopiastri- nica (valutazione della funzione emostatica primaria mediante PFA-100, tempo di emorragia, conta piastrinica) e quelli più espressamente rivolti alla fase coagu-

lativa (APTT, PT, fibrinogeno con metodica funzionale). Stabilito che il ruolo della via intrinseca della cascata coagulativa nel corso nei normali processi emostatici è pressoché nulla (pazienti omozigoti per fattore XII non manifestano alcuna diatesi emorragica), eventuali anomalie dei fattori che la compongono sono tuttavia validamente riflesse dall'APTT, tecnica che prevede l'attivazione del fattore XII (FXII) del plasma in vitro mediante vari substrati (silice, caolino, acido ellagico), ed in successione (a cascata) i fattori XI (FXI) e IX (FIX) in presenza di fattore VIII (FVIII). Allungamenti contestuali di PT ed APTT riflettono solitamente anomalie che coinvolgono fattori della via comune, secondo il classico modello della cascata coagulativa, mentre allungamenti isolati sono solitamente imputabili ad alterazione di specifici fattori della via estrinseca (PT) o intrinseca (APTT). Oggetto di questa rassegna è quindi la trattazione del ruolo del laboratorio di coagulazione e, nello specifico, della determinazione dell'APTT nell'approccio diagnostico alle più frequenti sindromi emorragiche congenite ed acquisite.

Inibitori acquisiti dei fattori della coagulazione. Una causa relativamente rara di emorragie acquisite è lo sviluppo di anticorpi contro i fattori della coagulazione. Malgrado siano riportati inibitori contro tutti i fattori della coagulazione, quelli diretti contro FVIII e FIX sono di gran lunga più frequenti. La patologia caratterizzata da sviluppo di inibitori contro FVIII ed FIX, nota anche come emofilia acquisita, ha incidenza compresa tra 0.2 e 1 casi per milione di abitante/anno. La prevalenza della patologia è però sostanzialmente sotto- stimata, a causa della difficoltà diagnostica e dell'elevata mortalità. Infatti, pazienti con inibitori di FVIII ed FIX mostrano di norma una grave e diffusa tendenza emorragica. Le due condizioni cliniche sono rappresentate con la medesima frequenza in entrambi i sessi, raggiungendo due picchi massimi di prevalenza in corrispondenza della terza e dopo la sesta decade di vita, in ragione di ben definiti fattori causali. Malgrado la patologia possa caratteristicamente esordire in soggetti con emofilia A o B e successiva sensibilizzazione alla terapia sostitutiva con fattori esogeni, in oltre il 50% dei casi non è possibile riconoscere una causa ben definita. La prevalenza della patologia varia dall'8 al 33% in pazienti con forme severe di emofilia A e dal 2.5 al 16% dei pazienti con forme severe di emofilia B. La prevalenza degli inibitori nei pazienti emofilici varia sostanzialmente in rapporto alla gravità del deficit del fattore, dal 50% dei casi nelle forme più

Tabella I. Cause di sindrome emorragica acquisita.

1. Coagulopatia intravascolare disseminata (DIC)
2. Alterazioni quantitative e qualitative piastriniche
3. Inibitori acquisiti dei fattori della coagulazione
4. Sindrome di von Willebrand acquisita
5. Uremia ed epatopatie
6. Deficit di vitamina K
7. Sovradosaggio da anticoagulanti
8. Amiloidosi
9. Emorragie in chirurgia dei trapianti
10. Emorragie dopo trasfusioni massive

Tabella II. Cause di emofilia acquisita.

1. Emofilia A o B	—
2. Idiopatico	52%
3. Patologie autoimmuni	17%
4. Tumori solidi	12%
5. Post-partum	11%
6. Farmaci	6%
7. Patologie linfoproliferative	2%

severe al 24% nelle forme più lievi. In pazienti non emofilici, cause frequenti sono patologie autoimmuni, tumori solidi, post-partum, farmaci e malattie linfoproliferative (Tab. II). Gli inibitori post-partum sono spesso identificati alla nascita o poco dopo; emorragie gravi durante il parto sono rare. Malgrado non sia possibile riconoscere una ben definita causa scatenante la comparsa di inibitori acquisiti dei fattori della coagulazione in gravidanza, non vi è motivo per temere successive recidive. Gli inibitori sono tipicamente immunoglobuline di classe IgG, prevalentemente IgG4 di classe kappa la cui attività si associa frequentemente ad attività del fattore inibito inferiore ad 1%. Il sito di legame ad FVIII è variabile; più frequentemente sono coinvolti i domini A2 della catena pesante e C2 della catena leggera. Il meccanismo alla base dello sviluppo di inibitori in pazienti non emofilici è tuttora ignoto; presumibilmente essi originerebbero in conseguenza di alterazioni immunologiche per risposte anomale e paradossali dei linfociti T ad antigeni ignoti od alterata interazione tra linfociti T e B.

Clinicamente, la comparsa di inibitori s'associa a sindromi emorragiche ad esordio acuto, generalizzato, ingrossante e rapidamente progressivo. Le manifestazioni cliniche sono simili ma non identiche per intensità e localizzazione a quelle delle forme più severe di emofilia congenita. Solitamente l'emofilia acquisita ha un esordio più acuto e drammatico rispetto alle forme congenite e le emorragie articolari sono infrequenti. Emorragie muscolari (32%) e cutanee (23%) sono estremamente frequenti; ciononostante, emorragie interne e quindi difficilmente riconoscibili, non sono rare, coinvolgendo l'addome nel 14% dei casi, la sfera ginecologica nel 10% dei casi, altri parenchimi nel 5% dei casi. Gravi emorragie intra e post-operatorie (14%) ed emorragie cerebrali (2%) sono altre importanti manifestazioni cliniche. La mortalità è condizionata dalla gravità della patologia ed è molto variabile; dipende sostanzialmente dal titolo dell'inibitore nel plasma, dall'età, dal deterioramento delle funzioni organiche, dal tempo trascorso tra diagnosi e comparsa dei sintomi, dalla localizzazione principale delle emorragie e dalla risposta individuale alla terapia. La mortalità globale della patologia rimane tra le più elevate, superando il 20% dei pazienti affetti. La terapia di eradicazione dell'inibitore condiziona moltissimo la prognosi, pur non superando il 50% dei casi. Remissioni spontanee si osservano di norma solo in presenza di inibitori post-partum o indotti da farmaci. L'iter diagnostico in un paziente con inibitori dei fattori della coagulazione prevede, di norma, la diagnosi differenziale con altre patologie caratterizzate da una sindrome emorragica drammatica ed ingrossante. Clinicamente, la localizzazione e la severità delle emorragie, l'assenza di fenomeni tromboembolici, la comparsa in età solitamente adulta, l'assenza di cause comuni di CID e la mancata risposta alla comune terapia anti-emorragica (plasma fresco) renderebbe la diagnosi di emofilia congenita e CID meno probabile. Ciononostante, il laboratorio rimane il cardine nella

diagnosi differenziale. Il quadro laboratoristico abituale di un paziente con inibitori contro FVIII o FIX è caratterizzato da un valore di APTT solitamente molto allungato, almeno due o tre volte la norma, in presenza di valori di PT e fibrinogeno solitamente normali o poco significativamente alterati. Caratteristicamente, l'APTT può presentare variazioni anche sostanziali da un giorno all'altro, subordinate alle contestuali oscillazioni del titolo dell'inibitore. Tenendo bene a mente il quadro clinico del paziente, nel sospetto di un'emofilia congenita, è consigliabile eseguire il test di miscela. In sintesi, il campione del paziente viene incubato in quantità equivalente (1:1) con un pool di plasmi normale per 2 ore a 37° C. La mancata correzione dell'APTT dopo il test è prova della presenza di inibitori. L'incubazione della miscela a 37° C per 2 ore è essenziale, poiché l'attività del 50% degli inibitori è tempo e temperatura dipendente. La valutazione del tipo di inibitore può essere facilmente dedotta dal dosaggio dei fattori della coagulazione, da cui apparirà un deficit grave di FVIII o FIX, in presenza di concentrazioni normali o poco indicativamente ridotte degli altri fattori della via intrinseca. Ultimo passo nella diagnostica di laboratorio è la titolazione dell'inibitore mediante metodo Bethesda. Una unità Bethesda viene definita come il livello del titolo in grado di inattivare il 50% del fattore in una miscela di incubazione dopo 2 ore a 37° C. Nel diagramma classico per la titolazione dell'inibitore, il rapporto dell'attività residua del fattore in termini percentuali (asse delle ordinate) rispetto all'unità dell'inibitore (asse delle ascisse), viene indicato dalla tipica linea retta. Il risultato, espresso in Unità Bethesda, distingue tra assenza di inibitore (< 1 UB/mL), inibitore a basso titolo (1-10 UB/mL) ed inibitore ad alto titolo (> 10 UB/mL).

La diagnosi di laboratorio di inibitori dei fattori della coagulazione può essere complicata dalla concomitante presenza di anticorpi anti-fosfolipidi o anti-cardiolipina a titolo elevato, i quali possono variabilmente interferire nella diagnostica in vitro, portando ad errori diagnostici e conseguente gestione clinica inappropriata del paziente. Analogamente, inibitori ad alto titolo possono simulare la presenza di anticorpi anti-fosfolipidi. In linea generale, il test dirimente dovrebbe essere il dosaggio dei fattori della coagulazione; in pazienti con inibitori puri risulta solitamente molto basso o indosabile solo il fattore verso cui l'inibitore è rivolto (es. FVIII o FIX); al contrario, in pazienti con anticorpi anti-fosfolipidi, appaiono bassi, ma non indosabili, tutti i fattori della via intrinseca. Casi rari ma possibili, sono pazienti con inibitori o anticorpi anti-fosfolipidi a titolo elevatissimo. In questo caso, sia i test per identificare gli inibitori, sia i test per la diagnostica degli anticorpi anti-fosfolipidi appaiono frequentemente alterati, poiché la presenza degli uni può determinare falsa positività per gli altri e viceversa. In particolare, un inibitore ad alto titolo può possedere attività così elevata da neutralizzare parzialmente o totalmente l'attività del fattore inibito anche nei plasmi carenti utilizzati per il dosaggio di altri fattori (si ricorda che il dosaggio dei

fattori della via intrinseca sfrutta un APTT modificato), determinando un "falso deficit" di altri fattori della via intrinseca e simulando la presenza di anticorpi anti-fosfolipidi. In questa critica situazione clinica, la prassi usuale consiste nell'eseguire il dosaggio dei fattori della via intrinseca a diluizioni scalari del plasma del paziente. In questo modo, l'eventuale interferenza dell'inibitore nel dosaggio di altri fattori si riduce. In pratica, se al dosaggio con plasma intero, molti o tutti i fattori della via intrinseca appaiono ridotti, alle successive diluizioni, solo l'attività del fattore verso cui è diretto l'inibitore si manterrà ridotta, mentre quella degli altri fattori tenderà progressivamente ad aumentare (Tabella II). Pertanto, ogni volta in cui sia sospettata la presenza di un inibitore in presenza di risultati aberranti di altri fattori della via intrinseca, è consigliabile eseguire il dosaggio dei vari fattori a diluizioni scalari con un pool normale. Il caso limite è rappresentato da pazienti con contemporanea presenza di inibitore ed anticorpi anti-fosfolipidi. In questo caso, l'associazione di positività al dosaggio dei fattori della via intrinseca ed al test di neutralizzazione con fosfolipidi dovrebbe indirizzare la diagnosi, poiché nel 90% dei casi gli inibitori non alterano il test di neutralizzazione.

Bibliografia

1. DeLoughery TG. Management of bleeding with uremia and liver disease. *Curr Opin Hematol* 1999;6:329-33.
2. Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Gungor T, Krackhardt B, Kornhuber B. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* 1992;339:594-8.
3. Franchini M, Capra F, Capelli C, de Maria E, Lippi G, Gandini G. Clinical efficiency of recombinant activated factor VII (rFVIIa) during acute bleeding episode and surgery in a patient with high inhibitor titer. *Haematologica* 2001;86:E12.
4. Franchini M, Capra F, Lippi G, Aprili G, Gandini G. Menorrhagia and inherited disorders of coagulation. *Minerva Ginecol* 2002;54:453-60.
5. Franchini M, Gandini G, Di Paolantonio T, Mariani G. Acquired hemophilia A: a concise review. *Am J Hematol* 2005;80:55-63.
6. Franchini M, Girelli D, Olivieri O, Bozzini C, Guiotto G, Zardini G, Lippi G, Manzato F, Gandini G. Clinical heterogeneity of acquired hemophilia A: a description of 4 cases. *Haematologica* 2005;90:ECR16.
7. Franchini M, Lippi G, Manzato F. Recent acquisitions in the pathophysiology, diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation. *Thromb J* 2006 21;4:4.
8. Franchini M, Lippi G. Parametri critici in medicina trasfusionale. *Riv Med Lab - JLM* 2001;2:1-10.
9. Franchini M, Lippi G. Approccio multidisciplinare alla diagnosi delle malattie emorragiche congenite. *Biochim Clin* 2002;27: 10-5.
10. Franchini M, Rossetti G, Tagliaferri A, Pattacini C, Pozzoli D, Lorenz C, Del Dot L, Ugolotti G, Dell'aringa C, Gandini G. Dental procedures in adult patients with hereditary bleeding disorders: 10 years experience in three Italian Hemophilia Centers. *Haemophilia* 2005;11:504-9.
11. Franchini M, Veneri D. Acquired coagulation inhibitor-associated bleeding disorders: an update. *Hematology* 2005;10:443-9.
12. Franchini M, Veneri D. Thrombosis and bleeding: when opposites are not so far apart. *Clin Lab* 2005;51:173-82.
13. Franchini M, Zaffanello M, Veneri D. Advances in the pathogenesis, diagnosis and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Thromb Res* 2005 Aug 26; [Epub ahead of print]
14. Franchini M. Recombinant Factor VIIa: A Review on Its Clinical Use. *Int J Hematol* 2006;83:126-38.
15. Franchini M. The antiphospholipid syndrome: an update. *Clin Lab* 2006;52:11-7.
16. Franchini M. The platelet function analyzer (PFA-100): an update on its clinical use. *Clin Lab* 2005;51:367-72.
17. Gandini G, Franchini M, Lippi G, Manzato F, Zatti M, Degani D, Balter R, Marradi P, Tatò L, Aprili G. Le coagulopatie congenite emorragiche. *Verona Medica* 2001;5:20-5.
18. Gandini G, Franchini M, Manzato F, Lippi G, de Gironcoli M, Piccoli P, Aprili G. Emofilia A acquisita: epidemiologia, diagnosi e trattamento. *Recenti Prog Med* 2000; 91:251-5.
19. Hampton KK, Preston FE. ABC of clinical haematology: Bleeding disorders, thrombosis, and anticoagulation. *BMJ* 1997;314:1026.
20. Horton JD, Bushwick BM. Warfarin Therapy: Evolving Strategies in Anticoagulation. *American Family Physicians* 1999;2:645-8
21. Kazmi MA, Pickering W, Smith MP, Holland LJ, Savidge GF. Acquired haemophilia A: errors in the diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9:623-8.
22. Lippi G, Franchini M, Brazzarola P, Manzato F. Preoperative screening: the rationale of measuring APTT in risk assessment. *Haematologica* 2001;86:328.
23. Lippi G, Franchini M. Laboratory screening for abnormalities of primary hemostasis. What's next? *Clin Chem* 2001;11:2071.
24. Lippi G, Mengoni A, Manzato F. Sensitivity of two commercial reagents for prothrombin time and activated partial thromboplastin time to isolate coagulation factor deficiencies. *Eur J Lab Med* 1999;7:61-5.
25. Lippi G, Montagnana M, Mattiuzzi C, Franchini M, Alberti V, Guidi GC. Preoperative laboratory testing. *Minerva Med* 2005;96:397-407.
26. Manzato F, Lippi G, Franchini M, Guidi G. Fisiopatologia della coagulazione: nuove acquisizioni. *Biochim Clin* 2004;28:1-13.
27. Mengoni A, Manzato F, Lippi G. Disordini congeniti rari dei fattori della coagulazione. *Med Lab* 1998;6:256-64.
28. Rinder MR, Richard RE, Rinder HM. Acquired von Willebrand's disease: a concise review. *Am J Hematol* 1997;54:139-45.
29. Rocha E, Paramo JA, Montes R, Panizo C. Acute

generalized, widespread bleeding. *Diagnosis and management. Haematologica* 1998;83:1024-37.

30. Sallah S, Nguyen NP, Abdallah JM, Hanrahan LR. Acquired hemophilia in patients with hematologic malignancies. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:730-4.

31. Salvagno GL, Berntorp E, Astermark J, Lippi G, poli G, Guidi GC. La generazione di trombina in pazienti con emofilia A. *RIMeL/IJLaM* 2005;Suppl.1:134.

32. Tefferi A, Nichols WL. Acquired von Willebrand disease: concise review of occurrence, diagnosis, pathogenesis, and treatment. *Am J Med* 1997;103:536-40.

33. Veyradier A, Jenkins CS, Fressinaud E, Meyer D. Acquired von Willebrand syndrome: from pathophysiology to management. *Thromb Haemost* 2000;84:175-82.

34. Weigert AL, Schafer AI. Uremic bleeding: pathogenesis and therapy. *Am J Med Sci* 1998;316:94-104.

SS16

ELETTROFORESI CAPILLARE DELLE PROTEINE URINARIE

M. Mussap

Laboratorio Centrale, Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino, Genova

L'elettroforesi capillare zonale è stata introdotta nella pratica routinaria dei laboratori clinici italiani circa 10 anni fa, inizialmente per la separazione delle proteine plasmatiche, permettendo di automatizzare il profilo proteico e di tipizzare le componenti monoclonali mediante immunosottrazione, con un'elevata qualità separativa delle frazioni proteiche. Ultimamente, l'elettroforesi capillare è stata messa a punto anche per la separazione di isoenzimi, emoglobine, isoforme della transferrina desialificata (CDT), e proteine urinarie. Nell'elettroforesi capillare, la separazione delle proteine avviene in un capillare in vetro di silice non rivestito, utilizzando due principi. Il primo si basa sulla creazione, a pH alcalino, di un potente flusso osmotico (movimento complessivo di cariche positive del tampone) verso il catodo; il secondo consiste nella separazione delle proteine, dipendente dal loro punto isoelettrico, dalla struttura terziaria e dal rapporto carica/massa a valori specifici di tensione, composizione dell'elettrolita e pH. A pH alcalino, la gran parte delle proteine possiede carica negativa. Applicando la tensione, il flusso elettrosmotico provoca la migrazione delle proteine verso il catodo. L'assorbanza delle proteine ad una lunghezza d'onda compresa tra 200 e 214 nm (a seconda del sistema impiegato) viene monitorata da un rivelatore di raggi ultravioletti che si trova in prossimità del catodo. Il tracciato dell'assorbanza di ciascuna frazione, in rapporto al tempo di migrazione, origina l'elettroferogramma.

L'elettroforesi delle proteine urinarie è un metodo qualitativo per lo studio della proteinuria ed è generalmente impiegato nel laboratorio clinico come test di scree-

ning per la ricerca della proteinuria di Bence Jones. Infatti, la tipica morfologia monoclonale della Bence Jones può essere evidenziata esclusivamente da metodi separativi, come appunto l'elettroforesi, capaci di evidenziare il picco all'elettroferogramma.

L'elettroforesi delle proteine urinarie è talvolta usata anche per classificare il tipo di proteinuria, anche se le determinazioni quantitative di singole proteine urinarie, come l'albumina, la transferrina, l'<1-microglobulina, le IgG, ecc., permettono di valutare più accuratamente il tipo di proteinuria. I vantaggi dell'elettroforesi capillare delle proteine urinarie rispetto ai metodi elettroforetici tradizionali su supporto solido (agarosio, acetato di cellulosa, ecc.) sono legati all'impiego di urina nativa, evitando fenomeni di perdita proteica e di polimerizzazione ed aggregazione delle catene leggere connessi alla concentrazione del campione, ed alla lettura diretta dell'assorbanza delle singole frazioni elettroforetiche, senza l'uso di coloranti. Tuttavia, l'elettroforesi capillare delle proteine urinarie richiede sia la rimozione dei sali dal campione prima della separazione elettroforetica, al fine di evitare interferenze all'elettroferogramma, sia l'amplificazione del segnale, per ottenere tracciati leggibili ed interpretabili.

L'osservanza di questi due aspetti, permette di usare l'elettroforesi capillare come metodo di screening per la proteinuria di Bence Jones, con una sensibilità pari a 85% che sale al 94% in campioni con proteinuria superiore a 100 mg/L. Infine, per quanto riguarda la tipizzazione della proteinuria di Bence Jones, la tecnica di immunosottrazione in elettroforesi capillare è significativamente meno sensibile dell'immuno-fissazione su gel d'agarosio, che rimane pertanto il metodo di scelta.

SS17

IL SISTEMA ESPERTO NEUROsoft: L'AUTOMAZIONE DEL PROCESSO DI REFERTAZIONE-PRIME ESPERIENZE

A. Vernocchi

Lab. Analisi, Ospedale Morgagni Pierantoni, Forlì

Un'Intelligenza Artificiale (AI) consiste in una serie di algoritmi software, che rendono il computer capace di mostrare abilità e discernimento tipiche della mente umana.

Nel caso dei tracciati sieroproteici, essa è formata da più reti neurali (una o più per ciascuna frazione proteica) che hanno la caratteristica di apprendere da modelli (Curve normali e anomale) che vengono loro forniti, e che costituiscono la sua base di conoscenza. Un sistema esperto è una intelligenza artificiale resa edotta attraverso un adeguato addestramento; attraverso quindi la creazione di una memoria con sufficienti esempi

L'utilità dell'utilizzo di una A.I. nel processo di refertazione di un quadro elettroforetico:

- Standardizzazione del processo di refertazione

- Misurazione del livello di anomalia e quindi evidenza della frazione anomala
- Eliminazione del grado di soggettività nella refertazione dei quadri elettroforetici.
- Aumento delle performances del sistema diagnostico (strumento + operatore), che non risente della stanchezza e della distrazione.
- Diminuzione drastica del tempo di refertazione, mediamente di 20"
- Diminuzione dell'esposizione al video terminale
- Conseguente risparmio di risorse umane ed economiche

Nella nostra valutazione, sono stati paragonati 1000 tracciati sieroproteici repertati dagli Specialisti del nostro Laboratorio, e gli stessi tracciati refertati dal sistema esperto. Ulteriori 1000 curve sono state successivamente paragonate con la stessa procedura, dopo aver "riaddestrato Neurosoft" con la creazione di una nuova base di conoscenza.

Sono stati quindi calcolati i risultati percentuali di concordanze e discordanze per ambedue le serie di 1000 curve, annotando, nella seconda serie di 1000 curve, l'eventuale miglioramento delle performances del sistema esperto, dopo l'addestramento con i campioni discordanti emersi durante l'analisi della prima serie di 1000 curve.

E' stata osservata una significativa concordanza tra Specialista e Sistema esperto, anche se riteniamo che il Sistema esperto non potrà sostituirsi allo Specialista di Laboratorio, ma rappresentare un ottimo ausilio nella fase di "valutazione preliminare" dei tracciati elettroforetici prima della refertazione.

SS18

METODOLOGIE DI VALUTAZIONE ANALITICA: IL CASO DEI MARCATORI CARDIACI

M. Zaninotto

Servizio Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Università degli Studi, Padova

L'evoluzione delle conoscenze sull'eziologia, patogenesi e fisiopatologia della cardiopatia ischemica ha consentito di definire con sicura evidenza che le tutte le manifestazioni cliniche comprese con il termine "sindrome coronaria acuta" non rappresentano entità distinte e separate, ma unificate dallo stesso substrato anatomico e da meccanismi fisiopatologici comuni. Da tale presupposto derivano le proposte recentemente emanate dalle Società Scientifiche di Cardiologia e di Medicina di Laboratorio relativamente al dosaggio di marcatori biochimici di danno miocardio.

Va rilevato, peraltro, che data l'importanza che tali dosaggi rivestono in ambiti diagnostici strategici per la diagnosi e cura del paziente, tra i quali monitoraggio e valutazione dell'efficacia della terapia, prognosi, stratificazione del rischio di eventi cardiaci maggiori e quindi tempo di sopravvivenza, la qualità dei risultati prodotti intesa nei termini sia di riproducibilità che di accu-

ratezza come pure di tempestività di refertazione e di efficienza delle informazioni fornite mediante l'utilizzo di opportuni e validati livelli decisionali, appare particolarmente rilevante. E' da ritenere quindi che nonostante siano ancora numerosi i problemi analitici che vanno affrontati e discussi in particolare per la determinazione delle troponine, ma anche dei più recentemente proposti peptidi natriuretici, e ancora di più di altri marcatori biochimici di nuova proposizione, l'asse di interesse per ciò che attiene alle specifiche di qualità in questo particolare ambito diagnostico, debba spostarsi per esplorare tutte le fasi che concorrono alla produzione di un risultato informativo di laboratorio. Le problematiche generali quindi potranno essere sostanzialmente differenti in relazione al quesito clinico e al marcatore biochimico più appropriato nelle particolari situazioni diagnostiche cui la determinazione stessa verrà applicata, se quindi nella diagnosi d'emergenza in pazienti con dolore toracico oppure nel monitoraggio del paziente e stratificazione del rischio oppure nella valutazione dell'efficacia della terapia.

La definizione di specifiche di qualità, allo stato attuale delle conoscenze biochimiche e fisiopatologiche, deve quindi essere ampliata a considerare le caratteristiche di prestazione intese in senso generale che comprendono in maniera rilevante le prestazioni analitiche, ma anche il tempo di risposta, le modalità di refertazione, i criteri di interpretazione dei risultati. Sono queste le variabili più importanti che concorrono a rendere utile ed efficace il risultato fornito dal laboratorio in un ambito clinico, come quello della "sindrome coronaria acuta" in cui un marcatore biochimico, la troponina, rappresenta l'attuale e riconosciuto "gold standard" diagnostico.

SS19

DATI PRELIMINARI DI UNA VALUTAZIONE MULTICENTRICA RELATIVA AD UN NUOVO METODO DI DOSAGGIO PER LA TROPONINA I: IL METODO PATHFAST

F. Di Serio¹, M. Caputo², M. Zaninotto³, M. Parimbelli⁴

¹*U.O. Patologia Clinica I, Policlinico di Bari*

²*U.O. Laboratorio Analisi, Ospedale di Bussolengo*

³*Dipartimento di Medicina di laboratorio, Ospedale di Padova*

⁴*U.O. Laboratorio Analisi, Ospedali Riuniti di Bergamo*

Introduzione. La troponina gioca un importante ruolo nel rule in/rule out AMI di pazienti con dolore toracico ed ECG non diagnostico e nella stratificazione prognostica di pazienti con sindrome coronaria acuta (SCA) che si presentano ai dipartimenti di emergenza. Una accurata e precoce stratificazione del rischio consente di instaurare tempestivamente un appropriato trattamento terapeutico al fine di migliorare l'outcome dei pazienti con SCA. E' responsabilità del laboratorio, individuare, tra tutti i metodi di dosaggio disponibili per

la Troponina I, quelli più sensibili, specifici, precisi e dotati di un rapido turnaround time (TAT). Scopo del nostro lavoro è quello di valutare, in uno studio multicentrico, la performance analitica del metodo PATHFAST (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc; Tokio, Japan) per il dosaggio della Troponina I, in accordo con i protocolli della NCCL e le raccomandazioni della IFCC. Materiali e Metodi. Il metodo PATHFAST per la Troponina I è un dosaggio immunoenzimatico in chemiluminescenza (CLEIA) che sfrutta la tecnologia MAGTRATION[®] per la separazione delle particelle magnetiche (le particelle sono lavate direttamente nel puntale). L'analizzatore processa fino a 6 campioni contemporaneamente. Precisione (NCCLS-EP5-A), limite di misura (sensibilità analitica), linearità (NCCLS-EP6-A), effetto interferente della bilirubina, lipidi ed emoglobina (NCCLS-EP7-P), accordo con il metodo Stratus CS ed Dimension RxL (analisi di Bland Altman), comparazione tra i metodi (regressione Deming), potenziale effetto matrice (siero, plasma litioeparina, sangue intero con K3-EDTA e plasma K3-EDTA), sono valutati.

Risultati. La sensibilità analitica risulta = 0.002 µg/L. L'imprecisione nel basso range è <10% per concentrazioni comprese tra 0.1 e 0.01µg/L. I risultati relativi al confronto tra differenti tipi di campione, evidenziano una soddisfacente confrontabilità dei risultati tra tutte le matrici considerate (bias non significativo); tuttavia la migliore correlazioni tra concentrazioni (range valutato 0.03-14.6 µg/L) è quella osservata tra siero e plasma litioeparina. Comparazione tra metodi; PATHFAST vs Stratus CS: bias assoluto (95% IC) = -2.0 (-3.88 a -0.26); bias percentuale (95% IC) = -13 (-45 a 17); $y = 0.47x + 0.27$; $Sy/x = 1.6$; $R2 = 0.90$. PATHFAST vs RxL: bias assoluto (95% IC) = -4.7 (-6.1 a -3.4); bias percentuale (95% IC) = -71 (-81 a -61); $y = 0.48x - 0.1373$; $Sy/x = 1.0$; $R2 = 0.97$.

Conclusioni. Gli studi di valutazione analitica sono ancora in corso, ma i nostri dati preliminari suggeriscono che il metodo PATHFAST per il dosaggio della cTnI è un metodo sensibile e preciso e potrebbe essere inserito come POCT in un dipartimento di emergenza; successivi studi dovranno valutarne l'impatto sulla operatività nelle diverse realtà e sul management dei pazienti con sospetta SCA.

SS20

INTEGRAZIONE DI UNA PIATTAFORMA IMMUNOLOGICA PER L'ANALISI DELLE CELLULE DEL SANGUE

G. Zini

Cattedra di Ematologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Gli Analizzatori Ematologici Automatici di ultima generazione, sotto la spinta della riorganizzazione laboratoristica, hanno perseguito l'approccio consolidativo pluritecnologico per fornire moli progressivamente cre-

scenti di referti validabili in prima battuta anche quando sono presenti e manifeste criticità del campione in grado variabile. Sono state implementate quindi, su singola piattaforma strumentale, metodologie di conta differenti e complementari (impedenziometria evoluta, scatter ottico pluridimensionale e fluorescenza). Espressione più recente della filosofia costitutiva è il nuovo analizzatore CELL DYN Sapphire[®] che impiega, oltre ad impedenziometria ed analisi LED un banco ottico citofluorimetrico a laser Coherent 488 nm e 4 rilevatori di scatter ottico su altrettanti differenti angoli e su tutte le popolazioni cellulari (Eritrociti, Eritroblasti, Reticolociti, Piastrine e Leucociti); Sono in più impiegati rilevatori per 3 differenti fluorescenze contemporanee associate agli spettri di emissione dei più comuni fluorocromi citofluorimetrici (530, 580, 630nm).

Oltre le comuni analisi cellulari a doppio metodo il sistema dimostra capacità analitiche correlabili ad espressioni immunologiche dei Cluster Designations di superficie delle cellule del sangue.

Sono stati valutati in maniera preliminare alcuni casi mediante tecnologia citofluorimetrica Sapphire per verificare la spendibilità del sistema in un laboratorio comune su problematiche correnti come: la dirigenza di pseudo o reali piastrinopenie (CD 61) l'analisi di sottopopolazioni linfocitarie (CD3/4/8) la verifica, a seguito di allarmi morfologici, di elementi precursori (CD34+CD45+) nel sangue periferico, in campioni di aferesi, la risposta o meno di una linea cellulare mieloide o linfoide (CD 19, CD 13, CD 33) con lo scopo di verificare l'apporto in FIRST PASS della nuova tecnologia al laboratorio nel quale una risposta celere e derimente su aspetti qualitativi o quantitativi delle conte cellulari è richiesta in maniera progressivamente crescente.

SS21

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELL'ANTIGENE CD20 CON METODICA CITOFLUORIMETRICA CELL-DYN SAPHIRE SU PAZIENTI SOTTOPOSTI A TERAPIA CON RITUXIMAB (MABTHERA?)

G. Del Poeta, A. Bruno, G. Giaccone, C. Simotti, F. Luciano, L. Maurillo, G. Ballatore, R. Lasorella, P. De Fabritis, S. Amadori
Cattedra di Ematologia, Università Tor Vergata, Ospedale S. Eugenio, Roma

La leucemia linfatica cronica (LLC) è la leucemia più frequente nel mondo occidentale dove rappresenta circa il 25% di tutte le leucemie (Chiorazzi N. et al NEJM 2005).

La terapia citoriduttiva con agenti alchilanti è efficace ma non è certo in grado di ottenere delle guarigioni. Di conseguenza diventa necessario cercare nuovi approcci terapeutici che mostrino un'efficacia superiore. Esiste la possibilità di utilizzare alcune molecole di membrana come bersaglio per una terapia con anticorpi monoclonali (AcMo) quali Alemtuzumab (anti-

CD52, Campath-1H) e Rituximab (anti-CD20, Mabthera).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di: 1) determinare la quota di cellule B (CD19, CD20) prima e dopo trattamento con Rituximab in pazienti con LLC mediante citometria Cell Dyn Sapphire; 2) verificare l'efficacia e la rapidità di esecuzione di un sistema citometrico semi automatizzato a piattaforma aperta.

I risultati preliminari hanno dimostrato che: 1) I dati ottenuti in percentuale mediante Cell Dyn Sapphire sono paragonabili con quelli ottenuti mediante citometria convenzionale utilizzando il citofluorimetro FacsCalibur (BDIS); 2) Le differenze che si sono verificate tra i 2 sistemi sono probabilmente da attribuire ad una metodica diversa, cioè no lyse no wash per il Cell Dyn Sapphire ed invece lyse and wash per la citometria convenzionale.

Quindi la metodica in modalità open a doppia marcatura utilizzando lo strumento Cell Dyn Sapphire è una procedura estremamente rapida e consigliabile nella pratica clinica.

Questo tipo di analisi potrebbe essere utilizzato anche per meglio identificare quei pazienti affetti da Linfoma non Hodgkin B (LLC) che potrebbero avere una buona risposta prima del trattamento con anticorpo monoclonale anti-CD20.

SS22

IL LABORATORIO INTEGRATO DI EMATOLOGIA: COME GARANTIRE PERFORMANCE E QUALITÀ

D. Campioli

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera, Università Policlinico di Modena

La diagnostica ematologica di laboratorio comprende una serie di attività molto eterogenee, citometria (emocitometria, citofluorimetria), morfologia (citologia, istologia), genetica e biologia molecolare; queste attività vengono spesso eseguite in strutture diverse e da operatori diversi.

Tradizionalmente il percorso diagnostico ematologico, soprattutto per quanto riguarda l'oncoematologia, è spesso frammentato in numerose frazioni di singole attività, ognuna delle quali fornisce il proprio risultato autonomamente ed indipendentemente dalle altre.

Il risultato rappresenta in questo modo solo un "dato" che per trasformarsi in informazione clinica necessita di essere integrato in un percorso virtuoso di conoscenze che ne arricchisca il contenuto informativo stesso. Per garantire la Qualità Globale dell'intero processo è necessario sempre più passare dal dato all'informazione diagnostica e quindi possibilmente alla diagnosi e quindi alla vera ricaduta clinica dell'attività di laboratorio.

Da qui nasce l'importanza di inserire nel processo di miglioramento continuo della Qualità anche la revisione di aspetti tecnologici ed organizzativi che tendano a favorire sempre di più l'aggregazione dei singoli

momenti individuali in un insieme che mediante il confronto e l'integrazione favorisca il raggiungimento dei massimi livelli di efficienza ed efficacia del percorso diagnostico nonché di crescita professionale dei diversi operatori coinvolti.

Nel Regno Unito vi è stato un riconoscimento istituzionale di tale esigenza con la recente formulazione di una linea guida del NICE (National Institute for Clinical Excellence) per il miglioramento dell'efficacia diagnostica nel campo delle emopatie maligne. In Italia la situazione è molto variabile e fortemente condizionata dalla storia delle singole realtà ospedaliere e dei centri ematologici.

Nel Policlinico di Modena le attività diagnostiche sono state storicamente divise in almeno quattro strutture autonome e indipendenti (Ematologia, Centro Trasfusionale, Laboratorio Analisi, Anatomia Patologica). Da anni è in corso una discussione che coinvolge tutti gli operatori interessati che hanno avvertito

l'esigenza dell'integrazione nel momento in cui, svolgendo ognuno la propria attività, avvertivano l'importanza di una condivisione dei vari passaggi per esprimere le migliori performance diagnostiche in tema di appropriatezza e tempestività delle procedure.

L'integrazione riguarda aspetti diversi: professionali, tecnologici, strumentali, informatici, logistici che possono trovare varie soluzioni a seconda delle condizioni specifiche del singolo centro. In questa logica la possibilità di disporre di tecnologie che, partendo dalla esecuzione dell'esame emocromocitometrico, possono aggiungere importanti informazioni morfologiche e immunofenotipiche, anche da unica piattaforma, può rappresentare uno strumento di grande utilità per rendere più efficiente ed efficace il percorso diagnostico.

SS23

NEW EVOLVING ROLES FOR CARDIAC MARKERS IN CLINICAL DECISION MAKING

C.P Price

University of Oxford, United Kingdom

Clinical decision making requires knowledge of the unmet need, the clinical question(s) that is being asked, the means of answering that/those question(s), and the appropriate action that is taken when the decision is made. This discussion will focus on the clinical questions for which cardiac marker measurements are thought to be of value, and the clinical decisions that can be made. The objective of such informed clinical decision making is improving health outcomes, which can be defined as maximising benefits, whilst minimising risks, at reasonable cost in the care of individual patients. My discussion will be limited to the measurements of cardiac troponin I and brain natriuretic peptide.

Troponin I is a marker of cardiac muscle damage from a pathophysiological standpoint; more specifically it

reflects a process of increased membrane permeability, as well as cell damage. From a clinicopathological perspective the issue is the relationship between the pathological change and the evolution of acute coronary syndrome. However from a health outcomes perspective the issues and questions are quite different. There are three broad potential applications of a troponin measurement (i) early diagnosis of acute coronary syndrome, (ii) risk stratification, (iii) and post intervention monitoring. Taking just the first two scenarios there are then a number of specific questions relating to the clinical setting e.g. primary care, emergency room, as well as whether earlier detection can lead to earlier intervention and a better outcome. In the case of use as a prognostic marker there is always the question as to what the clinician might do with the result to improve the outcome. All of the questions can only be answered by studies in which the marker is used to inform a clinical decision – and there are few such studies in the literature.

Brain natriuretic peptide is a peptide hormone and increased secretion is associated with stretching of the ventricle. Increased plasma levels are associated with heart failure. The broad areas of application of the measurement are the same as in troponin I but the settings are quite different – whilst the individual clinical questions are unique. The majority of studies have looked at the use of BNP to rule out heart failure in the emergency room, improving triage and use of echocardiography. Recently it has been suggested that BNP is a more sensitive marker of heart dysfunction than echocardiography, and so capable of earlier detection of heart failure. If this is proven then the clinical questions, and therefore clinical applications change dramatically. Similar issue arise in relation to risk stratification – how does it alter treatment and are outcomes improved? In relation to guiding and monitoring interventions there are several facets that need to be explored in proper outcomes studies – but provide the potential for an exciting clinical tool, because the current means of monitoring treatment are insensitive.

SS24

VALUTAZIONE CLINICA E ANALITICA DI MARCATORI CARDIACI DI NECROSI E DISFUNZIONE ESEGUITI IN AUTOMAZIONE: TROPONINA I ULTRASENSIBILE E BNP

R. Albertini

Servizio Analisi Chimico-Cliniche, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

La determinazione della troponina cardiaca come indicatore di lesione miocardica è entrata nella comune pratica di laboratorio; tuttavia, il test è ancora suscettibile di rivisitazione, che seguono le raccomandazioni delle società scientifiche nazionali ed europee di ambito cardiologico e laboratoristico. E' da sottolineare che nel 2000 l'infarto del miocardio è stato ridefinito secon-

do criteri nuovi, che pongono in primo piano il dato di concentrazione del marcatore sierico di lesione miocardica, che deve seguire un profilo di incremento e discesa secondo una cinetica nota; a questo criterio si aggiungono, su un piano secondario, almeno uno dei seguenti elementi: a) sintomi di ischemia, b) comparsa di onde Q patologiche all' ECG, c) alterazione del tratto ST all' ECG, d) esito dell' intervento di ripercussione (1). Il marcatore di lesione più raccomandato è la troponina I o T, in quanto cardiospecifica (il muscolo scheletrico esprime forme di troponina I o T con sequenza amminoacidica diversa, in quanto codificate da geni diversi rispetto a quelli espressi nel miocardio). Tuttavia, nell'ambito della patologia coronaria, il ruolo del laboratorio non è solo quello della esecuzione del test della troponina, poiché questo dato deve essere trasmesso ai clinici nella consapevolezza di una serie di informazioni aggiuntive che sono: a) conoscenza dei valori di riferimento per la troponina cardiospecifica (la I o la T) nella popolazione sana, con particolare indicazione del valore del 99° percentile, b) conoscenza del profilo di imprecisione per questo test, con particolare riguardo per il valore di concentrazione a cui corrisponde il 10% di imprecisione totale, valutato secondo il protocollo NCCLLS in un periodo di 20 giorni (2,3). La raccomandazione è che, nel caso la imprecisione del metodo al valore di troponina corrispondente al 99° percentile sia superiore al 10%, per evitare un eccesso di falsi positivi, il cutoff diagnostico di lesione deve essere innalzato comunque a quel valore di concentrazione che garantisce un CV uguale o inferiore al 10%. In termini ideali, quindi, un test di troponina deve avere una sensibilità analitica tale da garantire un CV (coefficiente di variazione) totale inferiore o almeno uguale al 10%, per il valore di concentrazione corrispondente al 99° percentile dell' intervallo di riferimento; questo in pratica non appare essere stato raggiunto a causa dei valori molto bassi di troponina negli individui sani, con i reagenti e gli strumenti disponibili fino ad oggi (4). In questa relazione saranno presentati questi dati per il metodo troponina ultra della Bayer Diagnostici, recentemente messa sul mercato; è di particolare riguardo che la valutazione di questo metodo è stata condotta su uno strumento attualmente in uso per la routine immunochimica del nostro laboratorio, e quindi i dati rappresentano le effettive proprietà di questo kit diagnostico "sul campo".

Bibliografia

1. Alpert JS, et al, J. Am. Coll. Cardiol, 2000, 36, 959,
2. Jaffe AS, et al, Circulation, 2000, 102, 12616-20,
3. Panteghini M, et al, Clin. Chem. Lab. Med., 2001, 39, 174-8,
4. Panteghini M., et al, Clin.Chem., 2004, 50, 327-32

SS25

LO SCREENING CITOFLUORIMETRICO DEI DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI

M. Geuna

Lab. di Citometria, IRCC, Candiolo (TO)

Nella diagnosi dei linfomi viene generalmente impiegato un approccio sistematico che comprenda la distinzione fondamentale tra lesioni reattive e neoplastiche, tra linfomi di Hodgkin e non Hodgkin, tra linfomi a cellule T o B o NK e la distinzione tra lesioni di natura blastica o mature. Il fine ultimo di un sistema classificativo dovrebbe essere quello di semplificare il processo diagnostico e di fornire al clinico "una etichetta diagnostica" utile sia all'inquadramento del paziente sia alle scelte terapeutiche. In particolare la classificazione WHO dei linfomi, adottando la classificazione REAL proposta nel 1994 dall'ILSG (International Lymphoma Study Group), fornisce il background per delineare le neoplasie del tessuto linfoide in quanto "entità" clinicopatologiche chiaramente distinguibili e quindi di stratificarle in base al lineage (B, T o NK) e infine in base allo stadio maturativo. Questo approccio classificativo è fondato sul principio che una classificazione è costituita da una lista di reali entità nosologiche che sono definite da una combinazione di caratteri morfologici, immunofenotipici, genetici e clinici. L'importanza relativa di ciascuno di questi caratteri varia per ciascuna entità e non esiste un unico "gold standard". L'immunofenotipo rappresenta pertanto uno dei possibili approcci alla diagnosi dei linfomi e deve essere sempre integrato agli altri caratteri della neoplasia. Le fondamentali peculiarità dell'immunofenotipo, in particolare di quello eseguito mediante citofluorimetria, sono determinate dalla sua potenziale capacità di distinguere sempre il lineage e in secondo luogo di fornire un inquadramento sufficientemente preciso dello stadio maturativo. Nella relazione verranno presi in esame i marcatori immunofenotipici necessari per la definizione di lineage e di stadio maturativo dei linfomi B con particolare riferimento alle malattie linfoproliferative croniche e all'impiego di marcatori con valenza prognostica.

SS26

UTILIZZO DI DIVERSE MATRICI BIOLOGICHE (SIERO E PLASMA) PER ALCUNI PARAMETRI IMMUNOCHEMICI SE ACCESS 2 IMMUNOASSAY SYSTEM: APPROCCIO METODOLOGICO ED ANALISI DEI RISULTATI

B. Osnaghi¹, G. Vignati²

¹Laboratorio Analisi, Ospedale Civile G. Fornaroli, Magenta (MI)

²Centro Malattie Endocrine e Metaboliche, Ospedale Civile G. Fornaroli, Magenta (MI)

La tendenza attuale al consolidamento di diverse tipologie di dosaggi (nel caso specifico i tradizionali test di

chimica clinica e le determinazioni di ormoni e marcatori tumorali eseguiti con tecnica immunochimica) sulla stessa piattaforma analitica e soprattutto sulla stessa provetta di prelievo ha reso necessario valutare eventuali effetti di tipo sistematico attribuibili all'utilizzo di una unica matrice biologica (siero e/o plasma) per entrambe le tipologie di dosaggi.

La praticabilità della fase preanalitica orienterebbe verso l'utilizzo di plasma; la tradizione consolidata e gli intervalli di riferimento disponibili, soprattutto per alcuni parametri ormonali imporrebbero l'utilizzo di siero senza anticoagulanti.

Nella relazione vengono descritte le metodologie sperimentali, l'approccio statistico ed i risultati ottenuti nel corso di una sperimentazione finalizzata alla verifica della possibile intercambiabilità di siero e plasma eparinato per la determinazione di alcuni parametri usati come modello (AFP, CEA, digoxina, progesterone, PSA totale e libero, estriolo non coniugato) ed eseguiti con tecnica immunochimica sul sistema analitico Access2 – Beckman Coulter.

SS27

LA MISURA DEL TSH E DELLE FRAZIONI LIBERE DEGLI ORMONI TIROIDEI: VALUTAZIONE ANALITICA DEI METODI SU UNICEL DXI 800

M. Migliardi, L. Germano

Lab. di Ormonologia, S.C. Endocrinologia, A.S.O. Ordine Mauriziano, Torino

La valutazione di laboratorio della funzionalità tiroidea si basa sulla misura del TSH (test di prima istanza) e su quella di FT4 e FT3. Perché ciò sia vero, i metodi utilizzati devono essere in grado di garantire prestazioni analitiche qualitativamente elevate, quali quelle raccomandate dalle linee guida NACB "Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease".

Nella nostra relazione saranno presentati i risultati di uno studio condotto per valutare le caratteristiche analitiche dei metodi di misura di TSH, FT3 e FT4 su immunoanalizzatore automatico UniCel DxI 800.

Per il TSH sono stati valutati: la sensibilità analitica, la sensibilità funzionale, l'imprecisione intra-saggio e inter-saggi a sei differenti livelli di concentrazione, il test di parallelismo effettuato su 4 diverse tipologie di campione e, infine, il confronto con il metodo di routine (Architect i2000, Abbott) eseguito su 500 campioni circa.

Per FT3 e FT4 sono stati valutati: la sensibilità analitica, l'imprecisione intra-saggio e inter-saggi a cinque differenti livelli di concentrazione, il test di diluizione con tampone fosfato e, infine, il confronto con i rispettivi metodi di routine (AutoDELTA, Perkin Elmer) eseguito su 400 campioni circa.

SS28

ANTICORPI ANTI-CCP: IL PUNTO DI VISTA DEL LABORATORIO

N. Bizzaro

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, Tolmezzo (UD)

La disponibilità di un parametro di Laboratorio per la diagnosi precoce di artrite reumatoide (AR), da affiancare alla consolidata ma poco specifica ricerca del fattore reumatoide (FR), è un aspetto di rilevante importanza clinica. Negli ultimi anni è stato messo a punto un test immunoenzimatico rapido, semplice e quantitativo, che utilizza come substrato peptidi sintetici ciclici citrullinati (CCP), il cui maggior vantaggio è dovuto alla elevatissima specificità diagnostica.

Benchè vi sia una buona correlazione tra la presenza di anti-CCP e FR, è però dimostrato come una parte (all'incirca il 10%) dei pazienti con AR risulti positivo solo per il FR e come viceversa gli anti-CCP si possano riscontrare nel 30-45% delle AR FR negative; l'uso combinato dei due test aumenta perciò significativamente la sensibilità diagnostica dei test immunologici. La contemporanea presenza del FR e degli anticorpi anti-CCP aumenta inoltre la specificità e il valore predittivo positivo portandoli a valori prossimi al 100%.

In sintesi, gli anticorpi anti-CCP sono uno tra gli anticorpi più interessanti apparsi sulla scena negli ultimi anni. La loro elevata specificità e l'alto valore predittivo positivo, ne consentono l'impiego sia a scopo diagnostico che prognostico nei pazienti con AR. Il consistente aumento di sensibilità ottenuto con il test di seconda generazione che mantiene nel contempo un'elevatissima specificità, ne propone la collocazione come test di primo livello in soggetti con sospetto di AR.

SS29

L'UTILIZZO DEI RICOMBINANTI DAL LABORATORIO ALLA CLINICA

R.E. Rossi

Unità di Allergologia, Servizio Sanitario Nazionale, Regione Piemonte, ASL 15 e ASL 17, Cuneo

Le conquiste dell'ingegneria genetica applicate alla produzione di allergeni molecolari, hanno trovato immediato impiego nella diagnostica di laboratorio. Già oggi, in diversi laboratori, è possibile dosare gli anticorpi specifici diretti verso alcuni allergeni rilevanti (es. allergeni ricombinanti) allo scopo di definire il profilo di sensibilizzazione del paziente allergico.

I profili di sensibilizzazione sono un utilissimo complemento diagnostico per orientare l'allergologo verso la scelta dell'estratto allergenico più idoneo alla terapia. Nel prossimo futuro gli allergeni molecolari (simili a quelli naturali), o parti di essi opportunamente modificati, saranno disponibili per un'immunoterapia che

rispetti fedelmente il pattern di sensibilizzazione del paziente, in altre parole, "confezionata su misura".

Ancora oggi l'allergologo ha un approccio "simil-erboristico" alla diagnosi e all'immunoterapia dovuto all'utilizzo di miscele eterogenee (costituite da componenti allergeniche e non-allergeniche). Auspichiamo che, in tempi ragionevoli, l'Allergologia entri in una "fase molecolare" che si avvalga di prodotti diagnostici e vaccini a contenuto allergenico noto, titolati in microgrammi per millilitro di allergene.

In un certo senso, la diagnostica basata su allergeni molecolari rappresenta per l'Allergologia Clinica, una vera e propria rivoluzione copernicana: fino a ieri, la presunta fonte allergenica era il punto di partenza per arrivare, attraverso l'impiego dell'estratto allergenico, alla diagnosi; oggi, grazie all'Allergologia Molecolare, si parte, appunto, dalla molecola e si arriva alla fonte allergenica.

SS30

MIGRATION TO AUTOMATION PLATFORM

R. Spooner

Biochemistry, Gartnavel General Hospital, Glasgow, United Kingdom

The Biochemistry Laboratory at Gartnavel General Hospital serves the West of Glasgow and covers around 1200 beds including a Regional Oncology Centre and more than 50 General Practitioners. In addition, it acts as a tertiary referral centre for some tumour marker analyses. Working from 0900 to 1700, the workload is around 4.5 million tests pa with an overall test/request ratio of 10.1. In 1999 the North Glasgow Hospitals Trust installed the first Bayer WorkCells worldwide, instrumentation that revolutionised their analytical processes.

In 2004, Greater Glasgow Health Board commenced a procurement exercise for the supply of equipment, consumables for around 20 million tests for Biochemistry, Haematology, Immunology and Virology laboratories in their 7 hospitals. This contract was awarded to Abbott Diagnostics in 2005 and in September 2005 interim placements of ci8200 analysers were made.

In January 2006, the first Accelerator APS system to be placed in a routine clinical laboratory was installed at Gartnavel General Hospital. The installation comprised an input/output module, twin centrifuges, 4x c8000 chemistry analysers and 2x i2000 immunochemistry analysers and a refrigerated storage module with a 15,000 tube capacity. Tube de-capping and resealing and automated disposal were also included. The Data Management System is the Analyser Management System (Omnilab, Italy). The system went live in May 2006 processing around 2200 serum, glucose and urine tubes daily.

Turnaround Time. Comparisons made between 2005,

where samples were spun offline, and 2006 show a reduction in median overall turnaround time from 101 to 97 minutes with 95% confidence intervals of 28-255 minutes and 66-186 minutes respectively.

STAT As part of the contract, a ci8200 is included for STAT samples. This has largely been phased out as the Accelerator APS allows such samples to be processed in a number of ways. A median TAT of 60 minutes (range 45-92) was found for samples experiencing in-line centrifugation compared with 41 minutes (range 23-70) for those spun offline. Both groups were introduced simultaneously using the STAT racks. This is expected to improve with the release of upgraded software.

Storage Stored samples can be retrieved in real time and the time from request to result had a median of 40 (range 18-118) minutes taking into account the current need to remove the seal from the sample.

Conclusion. The installation of the first Accelerator APS required a period of software enhancement prior to acceptance. The equipment has been reliable and the quality of results and EQA satisfactory. Expected enhancements include an upgrade to c16000 analyzers in 2007 with improved turnaround times.

SS31

UNA NUOVA VISIONE PER I LABORATORI DI ANALISI

A. Bianchini

Area Progettazione, Tecnologie e Procurement, Azienda Sanitaria Locale di Viterbo

I Laboratori di analisi da semplice servizio si trasformano in un'Area Strategica che deve tenere conto dei vincoli di complementarietà con gli altri operatori del servizio sanitario e dei rapporti intercorrenti con il sistema economico e sociale.

Da un lato la prestazione deve essere realizzata identificando, scegliendo e gestendo la combinazione ottimale dei fattori produttivi, al fine di raggiungere i migliori risultati e la massima competitività.

Dall'altro il mondo delle aziende deve modificare i propri comportamenti dominati dalle logiche commerciali ed accettare di rileggere i propri processi produttivi confrontandosi e legandosi al laboratorio, agendo fin dalla progettazione come vero partner di laboratorio.

Il progetto dell'ASL di Viterbo. L'Azienda ASL di Viterbo, consapevole di avere dei laboratori ospedalieri che presentano un assetto logistico e funzionale appartenente ad una visione che rispecchia un modello organizzativo ormai superato, ha deciso di costituire un gruppo di lavoro, unendo trasversalmente professionalità diverse, perché venisse realizzato un progetto di reingegnerizzazione dei laboratori di analisi che avesse come obiettivo finale la creazione di un "sistema laboratorio" che fosse in linea con i tempi, in grado di garantire delle prestazioni ad elevato livello di qualità, che assumesse un ruolo di collegamento e di

consulenza con i clinici, con essi collaborando anche nella stesura di protocolli e di linee guida.

Il progetto di reingegnerizzazione è stato costruito secondo le seguenti quattro fasi:

1. La revisione critica del processo produttivo;
2. L'impostazione del progetto;
3. Le nuove procedure per le forniture – Global Service ed Appalto Concorso;
4. La valutazione del progetto.

1. La revisione critica del processo produttivo

Sono stati esaminati con attenzione gli assetti di tutti i laboratori per quanto concerne i seguenti parametri:

- a) Logistica (planimetria generale e suddivisione strutturale delle varie sezioni)
- b) Personale (numero, qualifica e funzioni)
- c) Organizzazione del lavoro e produttività
- d) Informatizzazione (assetto e possibilità di sviluppo)
- e) Collegamenti (tra distretti ed ospedali e tra quest'ultimi)
- f) Linee analitiche

2. L'impostazione del progetto

Le parole chiave su cui si dovrà basare la progettazione sono le seguenti:

- consolidamento (omogeneità dell'offerta, identica piattaforma operativa con massimo consolidamento delle linee analitiche, centralizzazione in un'unica sede dei settori ad alta specializzazione lasciando in periferia solo le determinazioni veramente utili alla funzione assegnata a tali strutture);

- razionalizzazione (economicità della gestione mediante migliore utilizzazione delle risorse umane, rimodulando i flussi di lavoro, l'appropriatezza della richiesta e la funzionalità dell'attrezzatura);

- semplificazione (snellimento dell'attività amministrativa per ordinativi, fatturazione, immagazzinamento e gestione delle scorte).

3. Le nuove procedure per le forniture. Global Service ed Appalto Concorso

L'attuazione del progetto è logicamente condizionata dalla disponibilità degli investimenti necessari e dalla non disponibilità a breve dei fondi necessari per la ristrutturazione dei locali del laboratorio di Belcolle.

Questo progetto prevede la necessità per:

- la fornitura settennale in service di sistemi analitici automatizzati di diagnostica per i laboratori di analisi nelle aree della preanalitica, del siero, dell'ematologia, dell'elettroforesi, delle urine, della biologia molecolare e della batteriologia;

- i lavori da eseguire presso il Laboratorio centrale del P.O. di Belcolle;

- la fornitura in opera di arredi per il P.O. di Belcolle.

Per raggiungere questi obiettivi si è ritenuto che la formula del Global Service e della procedura di gara dell'Appalto Concorso fosse quella che potesse garantire meglio l'ASL di Viterbo.

4. Valutazioni del progetto

Per poter monitorare il progetto sono stati creati degli indicatori per poter misurare l'eventuale successo/insuccesso come:

- riduzione dei costi di gestione dei laboratori;

- riduzione impegno delle risorse dedicato alla funzione;

- aumento del rapporto prestazioni/operatore laureato;
- aumento del rapporto prestazioni/operatore tecnico.

SS32

MARKET DYNAMICS IN LABORATORY AUTOMATION: SOLUTIONS IN STEAD OF PROBLEMS

H.M.J. Goldschmidt

DeltaLab and DCT, The Netherlands

Automation is a critical success factor in many businesses within the service industry including laboratory medicine. To live up to the challenges of a 'on demand' environment, the medical laboratory has to study, organize and automate its processes. The NEXUS concept (see Clin Chem Lab Med 2004; 42:868-73) provides a framework that describes the complete diagnostic loop. Such a concept integrates the various activities needed but also leads towards a complete digitalised and individualised medical setting. From a quality point of view the medical laboratory has to proceed to the next innovation wave, to the next level of quality: zero error (Poka-Yoke). A formal approach towards the risk assessment of implementation of software within clinical chemistry offers the possibility to minimize those potential risks. Although quality assurance and assessment are common phenomena in laboratory medicine, the quality of soft- and hardware used is still a major problem. This creates a threat towards the total quality output of the medical laboratory. The laboratory of the future with its autoverification procedures, with internet access for each patient, with all kind of automated solutions, with a predictable quality, will strongly depend on automation. However the ever-increasing demand for more data, for more information will boost laboratory automation. But, at the same time instruments will become either very large or very small

SS33

CRITERI DI ANALISI DEI PROCESSI E DELLE PERFORMANCE DEI LABORATORI CLINICI

C. De Capitani

MIP, Politecnico di Milano, Milano

In un periodo di sempre maggiori sollecitazioni verso il risparmio ed il raggiungimento dell'efficienza nell'uso delle risorse sanitarie, il laboratorio analisi risulta essere sotto costante pressione. Seppur spesso il Laboratorio si distingue dalle altre Unità Operative per essere certificato ISO, caratterizzato dalla possibilità di avere tracciato il numero di test, i tempi e le risorse coinvolte, viene ritenuto dalle amministrazioni una delle aree migliori da cui poter trarre ancora più margine ed innalzare la qualità del servizio verso il cittadino. Tutte queste pressioni sul contenimento costi ed otti-

mizzazione delle risorse, unite all'incremento di litigiosità da parte del mondo dei fornitori, fa sì che strumenti e metodi di analisi esigenze e dei vincoli della specifica realtà e la pre-progettazione prima della gara, l'analisi e la comparazione dei diversi scenari durante la gara e valutazione delle performance di sistema quando il laboratorio è a regime, siano sempre più necessari e presenti nelle procedure di acquisto.

Il laboratorio. Tralasciando l'elevata complessità dovuta all'ampiezza del pannello dei test, alla varietà della strumentazione analitica e non, all'elevato impatto della componente umana, ed al prezioso output sarebbe facile paragonare il Laboratorio ad un reparto produttivo ad alta automazione. Considerando inoltre l'elevata variabilità che caratterizza il sistema laboratorio, ciò appare possibile solo a fronte d'elevata cautela.

Ciò che invece è possibile ed ormai necessario è mutuare le tecniche e metodologie di analisi e progettazioni che nascono in ambito produttivo, ma che sono ormai testate da anni in ambito sanitario.

Prevedere infatti quali saranno le performance produttive (TAT min e max, variabilità del TAT medio durante la giornata, saturazione delle risorse) in tale complessità è arduo. Un ulteriore livello di complessità è rappresentato dall'automazione, sia totale, che parziale (workcell, preanalitiche stand-alone, ..), che porta con se non automaticamente il vantaggio di abbattere il TAT, ma di standardizzarlo, di abbattere cioè la variabilità che spesso è risultato dell'elevata componente umana.

L'automazione richiede quindi valutazioni più dettagliate e calate nella specifica realtà, la definizione delle procedure gestionali con cui sarà impiegata (modalità di gestione delle regole di priorità dei campioni, back up organizzativo in caso di guasto di qualche componente, etc.). Il livello di dettaglio dei progetti deve crescere, tanto da poter permettere di comprendere, valutare e verificare esattamente come il laboratorio funzionerà, in termini di strumentazione e di singola attività da svolgere, sia a regime che in caso di avaria. Se a questo aggiungiamo il consolidamento strumentale, l'accorpamento dei laboratori e l'impatto del trasporto dei campioni dai punti prelievo, il supporto di tecniche quali la simulazione, la valutazione dei processi, l'individuazione dei colli di bottiglia diventano cruciali.

Valutare quindi gli scenari futuri richiede diversi criteri oltre ai valori del TAT, quali ad esempio la capacità di presidiare il processo da parte di un process owner, la flessibilità del sistema (es. diversi livelli di automazione durante le diverse fasi della giornata, la possibilità di gestire i campioni su diversa strumentazione in funzione delle esigenze contingenti, scegliendo semplicemente lo scenario A piuttosto che B con l'ausilio del Sw che deve prevedere questi scenari, la sicurezza, in termini di sicurezza dell'operatore, di tracciabilità totale del campione, di un back-up non solo strumentale, ma anche "organizzativo".

Si è pronti a reagire ad un guasto dell'aliquotatore o del sistema di trasporto campioni in un contesto di

TLA? Soprattutto perché poco probabile, lo staff ha valutato prima, con il supporto delle aziende, come deve modificare le proprie attività per reagire all'imprevisto nel minor tempo possibile?

Oltre il Laboratorio. Si vuole sottolineare con forza come il Laboratorio sia un servizio ad altissimo valore aggiunto all'interno di una catena di eventi diagnostici e terapeutici.

La folle corsa ad abbattere il TAT in laboratorio spesso si scontra con l'assoluta impossibilità a tracciare e quantificare i tempi che vanno dalla richiesta (o prelievo del campione) in reparto a quando il campione stesso arrivi effettivamente al laboratorio, sia che si tratti di routine che di urgenze, così come a seguito di un invio telematico del referto al reparto, rimane ancora poco quantificabile quanto tempo intercorra prima che le informazioni siano realmente utilizzate.

Il focus andrebbe quindi spostato sull'analisi delle esigenze, obiettivi e vincoli di tutta la catena "cliente-fornitore", cioè sulla serie di processi che unisce l'Unità Operativa richiedente e Laboratorio di analisi, passando dai trasporti e dai sistemi di consegne. Domande tipo: a che ora è più comodo il reparto a fare i prelievi? Che impatto ha questo orario sul carico di lavoro del laboratorio? A che ora verranno utilizzati i dati, secondo l'organizzazione dello specifico reparto? E cos' via.

Due domande chiave sono quindi: Quanto impatta il TAT del laboratorio sul TAT globale del campione o addirittura del TAT fra prelievo ed utilizzo dell'informazione? Come il Laboratorio e la mentalità orientata all'efficienza che lo caratterizza può supportare il miglioramento del TAT globale?