

**VALUTAZIONE DEL SISTEMA "REALTEST" (DELTA BIOLOGICALS)  
NELLA DIAGNOSI DI ALLERGIA ALIMENTARE**
**B-39**
**AT. Scacchetti, C.Canali, A. Carbonieri**

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche-Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Modena

*Premessa:* Per fare diagnosi di allergia alimentare è necessario dimostrare sia direttamente che indirettamente (prove cutanee) la presenza di IgE specifiche verso gli antigeni alimentari. Dato il crescente numero di sostanze da testare, ciascuna con proprie caratteristiche antigeniche, i sistemi analitici in uso devono essere continuamente adeguati e/o integrati per garantire elevati livelli sensibilità e specificità diagnostica sull'intera gamma degli allergeni da testare.

*Scopo del lavoro:* Valutare le performance diagnostiche del sistema diagnostico MagoPlus (Delta Biologicals)

*Materiale e metodi:* Lo studio è stato condotto su una popolazione di 81 pazienti (44 femmine e 37 maschi) di età compresa fra 2 e 58 anni, comprendente casi con anamnesi positiva e/o prick test positivi per alimenti ma IgE specifiche negative, casi con IgE specifiche positive o negative confermati dalla clinica, pazienti con IgE specifiche positive per alimenti ma asintomatici e individui sani non atopici. Sono state testate le IgE Specifiche per: albume (F1), latte (F2), pesce (F3), grano (F4), pisello (F12), arachidi (F13), pomodoro (F25), scampi o gamberi (F24) su "UniCAP-Pharmacia", in uso routinario, e su "Realtest" MagoPlus (Delta Biologicals) che utilizza la tecnica REAST (Reverse Enzyme Allergo Sorbent Test), metodo ELISA che presenta il vantaggio di testare contemporaneamente, con lo stesso metodo di cattura, sia le IgE specifiche che le IgE Totali e quindi di fornire la percentuale di concentrazione di IgE allergene-specifiche (densità), che è correlata al rilascio di mediatori dalle cellule con recettori per IgE ed alla presunta gravità clinica della sensibilizzazione.

*Risultati:* Si è evidenziata una percentuale significativa di pazienti, negativi ai tests in uso, ma positivi ai tests in valutazione, che sulla base di questi dati possono essere recuperati in un quadro complessivo di atopia: è il caso degli allergeni F1, F2, F4 (percentuali di risposte positive dal 16% al 50%). In questi casi sarà necessario eseguire indagini supplementari per confermare la validità del metodo in prova. La correlazione della percentuale della densità con le IgE Totali attesta una soddisfacente linearità: l'adozione di un cut-off potrebbe essere utile per evidenziare la presunta gravità clinica in relazione a questa ulteriore indicazione.

*Conclusioni:* Possiamo considerare questo lavoro come la prima parte di uno studio che si propone di indagare su un ampio numero di pazienti per singolo alimento ma soprattutto ci induce a proseguire nella conferma delle positività ottenute che, se validate, aprono ulteriori prospettive per la integrazione del sistema esaminato nella realtà di un laboratorio di diagnostica allergologica in vitro.

**IL TEST COMBINATO NELLA DIAGNOSI PRENATALE DELLA SINDROME DI DOWN**
**C-01**
**M. Carta, A. Fortunato, P. Catapano, G. Soffiati**

Laboratorio di chimica clinica ed ematologia; Divisione di Ostetricia e Ginecologia - Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

*Scopo del lavoro.* Il test combinato ha dimostrato in studi recenti una buona detection rate (89%) con 5% di falsi positivi (Spencer K, Ultrasound Obstet Gynecol 1999;13:231-7). Dal 2001 il nostro laboratorio propone questo test come screening per la sindrome di Down.

*Materiali e metodi.* Il test combinato si basa sulla combinazione della misurazione della translucenza nucale (STN) (raccolta di fluido compresa tra la cute e la colonna cervicale del feto), il dosaggio di due parametri biochimici materni, free b hCG e proteina A plasmatica associata alla gravidanza (PAPP-A) (Immulate 2000 DPC, Los Angeles, CA) e l'età materna. Il modello statistico utilizzato per l'elaborazione del calcolo è quello ideato dalla FMF (Fetal Medical Foundation). L'esame viene eseguito nel primo trimestre di gravidanza, in stretta collaborazione tra ginecologia e laboratorio.

*Risultati.* Dal dicembre 2001 ad agosto 2004 sono stati eseguiti 1635 test combinati. Di questi sono risultati positivi 102 test (6.2%) (cut off 1:300). 38 tra le pazienti positive hanno eseguito approfondimento diagnostico (amniocentesi o villocentesi). Tra queste 9 pazienti presentavano un feto con trisomia (8.8%) e 1 sindrome di Turner. Una paziente con carioripo riferito normale partorì una bambina con sindrome di Cornelia de Lange. Tra le pazienti che scelsero di non approfondire, 44 pazienti partorirono un feto sano, 2 abortirono spontaneamente, uno in 16 settimane, l'altro in 6 mesi. Per altre 18 pazienti la gravidanza è ancora in corso. Una paziente con test combinato alterato scelse di non approfondire e partorì un bambino con trisomia.

*Conclusioni.* Il test combinato ci ha permesso di riconoscere 10 casi di trisomia in 1635 pazienti e 1 caso di sindrome di Turner. Limitando l'analisi alle 1508 pazienti sottoposte a screening entro febbraio, su cui disponiamo di dati completi, i falsi positivi sono stati 73 (4,8%). Due pazienti hanno abortito ma non disponiamo del cariotipo fetale. Tali dati sono coerenti con i dati disponibili in letteratura. Al momento non abbiamo avuto riscontro di falsi negativi e quindi abbiamo diagnosticato il 100% delle anomalie.

**IL CONTEGGIO EMATICO PIASTRINICO RISULTA INVERSAMENTE CORRELATO AI LIVELLI PLASMATICI DI OMOCISTEINA E DIRETTAMENTE CORRELATO ALLE CONCENTRAZIONI DI sE-SELECTINA E DI sP-SELECTINA IN DONNE CON MUTAZIONE OMOZIGOTE MTHFR C677T**

C-02

**M. Rongioletti (1), A. Falconio (1), C. Vaccarella (1), E. Capoluongo (2), F. Papa (1), M. Cortesi (1), B. Rocca (3), R. De Cristofaro (3), E. Cirese (4), E. Forastiere (1), F. Ameglio (1)**

1)S.C. Lab. Patologia Clinica, Osp. S. Giovanni Calibita, FBF/AFAR; 2) Dip. Biochimica e Bioch. Clinica, Univ. Cattolica S. Cuore; 3) Serv. Mal. Emorragiche e Trombotiche, Univ. Cattolica S. Cuore e 4) S.C. Ginecologia Ostetrica, Osp. S. Giovanni Calibita, FBF/AFAR, Roma.

*Scopo del lavoro:* Questo lavoro descrive il comportamento dei livelli piastrinici ed omocisteinici in 165 donne (pre-gravidanza o nel primo trimestre di gravidanza) che presentavano differenti associazioni delle varianti MTHFR C677T e A1298C. Sugli stessi soggetti sono state determinate le seguenti variabili ematiche: WBC, RBC, MPV, Folati, Vit. B12, Glucosio, Creatinina, Colesterolo totale, sE- e sP-selectina.

*Materiali e Metodi:* I dosaggi di omocisteina, sE- ed sP-selectina sono stati effettuati con sistemi ELISA, i polimorfismi MTHFR con ibridazione inversa e le altre determinazioni mediante indagini routinarie biochimiche o ematologiche.

*Risultati:* Una correlazione inversa significativa ( $R=-0.88$ ,  $p<0.001$ ) e' stata osservata tra omocisteina e conta piastrinica solo tra i soggetti omozigoti per MTHFR C677T. Tale correlazione non era collegata a nessuna delle altre variabili o condizioni considerate ad eccezione dei livelli di E- e P-selectina, significativamente aumentati, che erano invece direttamente correlati ai livelli di omocisteina (rispettivamente  $R=0.45$  e  $R=0.41$ ,  $p<0.01$ ) esclusivamente nello stesso sottogruppo di soggetti.

*Discussione e conclusioni:* Questi risultati suggeriscono che l'omocisteina condiziona il numero di piastrine in presenza di omozigosi MTHFR C677T (enzima a ridotta funzione) probabilmente mediante attivazione piastrinica ed endoteliale, espresse dai livelli delle due selectine. Questi risultati spiegherebbero il recupero ritardato dei livelli piastrinici dopo terapia con methotrexate per cancro ovarico riportato in letteratura in donne con omozigosi C677T e potrebbero contribuire all'aumento del rischio trombotico descritto per i portatori di tale mutazione omozigote.

**MUTAZIONI RARE DIAGNOSTICATE MEDIANTE "FLUORESCENCE ASSISTED MISMATCH ANALYSIS" NELLA FIBROSI CISTICA**

C-03

**R. Tennina\*, P. Moretti§, S. Martinotti#, V. Dolo\*, A. Pavan\***

\*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di L'Aquila; § Centro Fibrosi Cistica-Regione Abruzzo, Ospedale Civile - Teramo; #Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Università di Chieti-UD'A

*Scopo del lavoro.* Il gene responsabile della Fibrosi Cistica (cftr) è stato isolato nel 1989 sul braccio lungo del cromosoma 7. Ad ora, si sono descritte oltre 1300 mutazioni, ma soltanto alcune possono essere raggruppate in cluster di maggiore frequenza. Data l'estensione del gene, è ipotizzabile che possano esistere mutazioni non identificate e che possano essere anche non localizzate esclusivamente all'interno degli esoni. Data l'elevata frequenza e l'eterogeneità geografica delle forme mutanti è fondamentale poter disporre di sistemi d'indagine accurati che permettano di testare velocemente il maggior numero possibile di mutazioni nell'individuo e/o nel feto.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di utilizzare una nuova metodica d'indagine molecolare che potesse consentirci: a) una maggior accuratezza diagnostica nell'analisi mutazionale, b) la possibilità di evidenziare mutazioni de-novo lungo il locus del gene cftr.

*Materiali e Metodi.* Tale metodica denominata F.A.M.A. (Fluorescence Assisted Mismatch Analysis), ci consente un'analisi di frammenti di DNA amplificati con reagenti fluorescenti mediante PCR non radioattiva. I frammenti amplificati, lunghi fino a 1500 bp comprendono sia gli esoni sia porzioni introniche a monte ed a valle degli esoni stessi. La tecnologia F.A.M.A. offre altresì la possibilità di individuare all'interno del frammento in esame l'esatta posizione dell'eventuale mutazione, nonché il tipo di mutazione quali SNP, delezioni, duplicazioni, inserzioni, frameshift, definendo una mappa genotipica del locus senza possibilità di falsi negativi per l'individuazione di mutazioni rare.

*Risultati.* Abbiamo selezionato ad oggi, un gruppo di 33 pazienti i cui dati clinici della presenza della patologia FC erano inequivocabili. Seguendo il nostro schema diagnostico tutti i pazienti e loro familiari sono stati sottoposti al test CFTR-OLA PCR per la valutazione delle mutazioni più frequenti. L'indagine fatta sui 33 pazienti ovvero 66 cromosomi ha permesso di stabilire una diagnosi molecolare certa per 57 di loro, 9 cromosomi sono risultati unknown. Su questi ultimi abbiamo proceduto all'indagine F.A.M.A. che ha consentito, ad oggi, di identificare 4 mutazioni rare di cui una a carico di un paziente che al test CFTR-OLA PCR era risultato completamente negativo.

*Discussione e Conclusioni.* Dai risultati ottenuti possiamo affermare che la metodica F.A.M.A. può validamente contribuire a completare l'analisi mutazionale del gene cftr, offrendo al tempo stesso una elevata accuratezza diagnostica, riproducibilità, velocità di esecuzione e bassi costi di esercizio.

## IL GENOTIPO 192BB DELLA PARAOXONASI E' ASSOCIATO CON LA PRESENZA DI IPERTENSIONE ATERIOSA

C-04

**M. Marra, F. Marchegiani, R. Antonicelli, C. Sirolla, L. Spazzafumo, F. Olivieri, C. Franceschi, G. Paolisso, RW. James, M. Boemi, I. Maccaroni, R. Testa, G. Parati**

Istituto Nazionale Ricovero e Cura per Anziani, INRCA - IRCCS, Ancona

*Scopo del lavoro.* Investigare se il polimorfismo genetico della paraoxonasi (PON1 192), un enzima capace di proteggere le lipoproteine a bassa densità LDL dall'ossidazione, fosse in relazione con la presenza di ipertensione arteriosa.

*Materiali e Metodi.* Sono stati reclutati un gruppo di soggetti sani non imparentati (n=219) e un gruppo di soggetti con ipertensione arteriosa primaria senza nessun trattamento farmacologico (n=119). Sono stati determinati i principali parametri clinico metabolici e il polimorfismo PON1 192 con la tecnica PCR-RFLP.

*Risultati.* I soggetti ipertesi avevano una più bassa frequenza del genotipo PON1 192AA (46.2% vs 55.7%) ed una più alta frequenza del PON1 192BB (14.3% vs 5.0%) rispetto ai soggetti di controllo. Quindi la frequenza dell'allele B era significativamente più alta nei soggetti con ipertensione rispetto ai soggetti di controllo (37.2% vs 24.7%, p=0.015). L'analisi di regressione logistica ha mostrato che il genotipo PON1 192BB aumenta indipendentemente di 4 volte la suscettibilità alla ipertensione arteriosa (OR 4.31; CI, 1.63-11.43, p=0.003).

*Discussione e Conclusioni.* L'evidenza che il genotipo PON1 192BB è associato con la presenza di ipertensione arteriosa può essere utile per meglio stratificare i pazienti per il loro rischio cardiovascolare. La valutazione del polimorfismo PON1 192, nei pazienti ipertesi prima della manifestazione clinica delle complicanze, potrebbe identificare una popolazione con una particolare alta tendenza a sviluppare la malattia cardiovascolare dove il polimorfismo PON1 192 potrebbe contribuire a modulare questo rischio.

## SEGNALAZIONE DEL PRIMO CASO ITALIANO DI UN DONATORE HBsAg NEGATIVO HBV-DNA POSITIVO RITROVATO CON LO SCREENING NAT APPLICATO IN ROUTINE

C-05

**G. Gessoni<sup>1</sup>, G. Marchiori<sup>2</sup>, P. Barin<sup>2</sup>, G. Pisani<sup>3</sup>, G. Gentili<sup>3</sup>, F. Bressan<sup>4</sup>, G. Aprili<sup>4</sup>**

1) CT A-ULS 14 Chioggia. 2) SIT A-ULS 12 Veneziana. 3) RPI ISS Roma. 4) SIT AO Verona

*Scopo del lavoro:* Nel SIT di Mestre abbiamo approcciato il test per HBV-DNA nel primo trimestre dell'anno 2003, dopo un'analisi di fattibilità e compatibilità e dopo aver eseguito uno studio di validazione del nostro laboratorio, nel marzo 2003 abbiamo deciso di introdurre il test per HBV-DNA nel procedimento di qualificazione biologica delle unità ematiche a fianco dello screening per HCV-RNA e HIV-RNA. Presentiamo qui il primo caso di donatore HBsAg negativo HBV-DNA positivo trovato in una applicazione routinaria dello screening per HBV-DNA.

*Materiali e Metodi:* Lo screening NAT per HBV-DNA è stato eseguito utilizzando il metodo Ampliscreen HBV (Roche Molecular System, Branchburg NJ) seguendo le procedure consigliate dal produttore. I mini-pool, formati da 24 unità, vengono allestiti utilizzando una strumentazione Tecan genesys con un volume finale di 1 mL.

*Risultati:* In dodici mesi sono state esaminate 26.900 unità ematiche ottenute da 11.897 donatori di cui 10.451 "repeat" e 1.446 "first time". Abbiamo ritrovato un donatore HBsAg negativo ma positivo per HBV-DNA. MC maschio bianco di 58 anni, 67 donazioni sino al Novembre 2003. MC era positivo per anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs (34 UI/L), con ALT sempre nella norma. Il campione risultava negativo per HBsAg utilizzando i seguenti metodi: Ortho EIA, Abbott EIA, Abbott MEIA, Roche EIA; negativo per anti-HDV (Abbott EIA), negativo per anti-HBc IgM (Abbott MEIA). La reattività per HBV-DNA veniva confermata con metodica Chiron TMA. Una PCR in house eseguita presso il Laboratorio del Reparto Prodotti Immunologici dell'Istituto Superiore di Sanità utilizzando differenti set di primers ha permesso di amplificare solo la regione Core ma non la regione pre-S / S. La quantificazione del viral-load non risultava possibile in quanto la concentrazione di HBV-DNA risultava inferiore al limite inferiore di sensibilità del metodo utilizzato; Cobas Amplicor Monitor HBV (1200 copie/mL).

*Discussione e Conclusioni:* Si tratta di un singolo report senza alcuna pretesa di voler presentare dati di rilievo epidemiologico. Tuttavia il caso osservato presenta, a nostro avviso, alcuni dati di interesse. MC era un donatore abituale con evidenza sierologica di pregressa infezione da HBV ed un titolo di anti-HBs (34 UI/L) che sebbene non elevatissimo è considerato protettivo, inoltre il pattern dei marcatori di HBV era invariato dal 1992. Il donatore era un "low level carriers" per HBV-DNA e risultava infetto con un ceppo virale mutante in regione S / pre-S.

**RICERCA DI BORRELIA BURGdorFERI SU CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE METODI CULTURALI E DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

C-06

**G. Piccolin, M. Forni, E. Francavilla\*, C. Granata\*, F. Guzzo\*, E. Modolo, V. Mondardini\*, N. Papa, R. Schiavon, C. Zasio, G. Bertiato**

Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e di Microbiologia, \* Malattie Infettive - Ospedale "San Martino" ULSS n. 1 di Belluno

I problemi diagnostici legati alla Borreliosi di Lyme sono stati affrontati a Belluno fin dai primi anni '90 con tecniche di indagine diretta e indiretta. L'impiego di tecniche di biologia molecolare per la ricerca di *Borrelia burgdorferi* in campioni biologici ha consentito un confronto con i risultati ottenuti usando il tradizionale esame culturale. *Materiali e Metodi.* Nel corso degli anni 2001-2003 sono stati avviati all'esame culturale per *Borrelia burgdorferi* complessivamente 212 campioni, con l'impiego del terreno di coltura MKP. Su tali campioni è stata effettuata un'ulteriore indagine mediante PCR. Sono stati esaminati 180 biopsie, 21 liquor, 3 liquidi articolari, 1 liquido extra-articolare e 7 tamponi cute. Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il metodo fenolo/cloroformio; ciascun estratto è stato amplificato con primers che amplificano una regione del gene costitutivo della b-globina, e quindi con primers c/c' specifici per *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Rosa, 1991). I campioni positivi sono stati successivamente tipizzati con i primers che amplificano regioni specifiche delle tre genospecie considerate patogene per l'uomo: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* e *B. garinii* (Misonne, 1998).

*Risultati.* Dei campioni del 2001, 17 sono risultati contaminati, 47 positivi e 31 negativi; l'indagine mediante PCR ha permesso di individuare 4 campioni positivi tra i negativi all'esame culturale, mentre 2 campioni risultati positivi in coltura sono risultati negativi in PCR. Dei campioni del 2002, 7 sono risultati contaminati, 34 positivi e 42 negativi; mediante PCR sono stati evidenziati due campioni positivi in più; tutte le altre positività sono state confermate. Dei campioni del 2003, 3 sono risultati contaminati, 16 positivi e 15 negativi: l'analisi in PCR ha permesso di confermare tutte le positività e un ulteriore campione positivo. Dei materiali risultati positivi in PCR, 44 campioni del 2001 appartengono alla specie *B. afzelii*, 2 di questi sono risultati contemporaneamente positivi per *B. garinii* e per *B. afzelii*, e 5 non sono risultati appartenenti alle tre genospecie saggiate. I 50 campioni positivi del 2002 e 2003 appartengono a *B. afzelii*.

*Conclusioni.* L'utilizzo del terreno di coltura MKP ha consentito un aumento percentuale degli isolamenti rispetto al terreno BSK II, utilizzato negli anni precedenti. L'uso in PCR di primer specifici ha permesso di individuare 7 positività in campioni risultati negativi all'esame culturale. Per quanto riguarda l'indagine genotipica, l'assoluta prevalenza di *B. afzelii* può essere collegata alle sue note caratteristiche di dermatotropismo.

**PRESENZA DI BORRELIA BURGdorFERI IN ZECHE PRELEVATE DA PAZIENTI IN PRONTO SOCCORSO**

C-07

**G. Piccolin, M. Battistel, M. Forni, G. Gouigoux', F. Merola\*, N. Papa, A. Tocchio°, G. Bertiato**

Centro Regionale di riferimento per la diagnosi delle malattie trasmesse da zecche, ULSS n.1 Belluno  
\*Pronto Soccorso Ospedale Belluno; °Pronto Soccorso Ospedale Pieve di Cadore, 'Pronto Soccorso Ospedale Agordo

La diffusione delle zecche nel territorio alpino è in costante aumento ed è ormai noto che questi parassiti sono vettori di microrganismi che possono causare nell'uomo patologie severe, come la Borreliosi di Lyme e la TBE, ma anche altre patologie, al momento meno conosciute e frequenti. Il Bellunese costituisce di fatto, per le sue peculiari caratteristiche climatiche ed ambientali, un osservatorio privilegiato per lo studio dei fenomeni di diffusione di tali microrganismi e fertile territorio per l'analisi dei problemi epidemiologici ad essi correlati.

*Scopo del lavoro.* Nei Pronto Soccorso dell'ULSS di Belluno, è stata effettuata la ricerca di *Borrelia burgdorferi* in zecche, direttamente prelevate da pazienti presentatisi per la rimozione.

*Materiali e Metodi.* Sono state raccolte 48 zecche (32 ninfe, 10 femmine, 3 larve e 3 campioni costituiti da frammenti di parassiti) prelevate complessivamente da 37 pazienti: 12 del Pronto Soccorso di Belluno, 13 di Pieve di Cadore e 12 di Agordo, tra aprile e maggio del 2004. I campioni sono stati conservati in alcool al 70% ed inviati al Laboratorio Analisi di Belluno per la ricerca di *Borrelia burgdorferi*; il DNA è stato estratto con il metodo di estrazione con fenolo/cloroformio. Ciascun estratto è stato dapprima amplificato con la coppia di primers 16a/16b che amplificano una regione del DNA mitocondriale di *Ixodes ricinus* (Matuschka, 1996) per verificare l'appartenenza alla specie. Per la ricerca di *Borrelia burgdorferi* è stata utilizzata quindi la coppia di primers c/c' specifici per *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Rosa, 1991). I campioni risultati positivi sono stati successivamente tipizzati con i primers MC16, MC25 e MC33 che amplificano regioni specifiche delle tre genospecie considerate patogene per l'uomo: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* e *B. garinii* (Misonne, 1998).

*Risultati.* Dei 48 esemplari analizzati, 7 (14.6 %) sono risultati positivi per *Borrelia burgdorferi*: 2 femmine e 5 ninfe. Le successive indagini per la tipizzazione dei campioni positivi hanno rivelato che tutti i campioni appartengono alla specie *B. afzelii*.

*Conclusioni.* I risultati ottenuti mettono in evidenza l'elevata incidenza del tasso di positività negli esemplari raccolti, confermando quindi l'importanza di un sistema di monitoraggio del territorio; inoltre la forte prevalenza di *B. afzelii* sulle altre genospecie è in linea con i dati europei.

### DESIGN E UTILIZZO GENETICO DI UN KIT MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE DEL POLIMORFISMO -765 G>C NEL PROMOTORE DEL GENE COX2 PREDITTIVO DELLE PATOLOGIE CARDIOVASCOLARI.

C-08

S. Ursi\*, F. Cipollone<sup>^</sup>, E. Toniato<sup>^</sup>, G. Vitullo\*, A. Iezzi<sup>^</sup>, M. Fazia<sup>^</sup>, A. Tavella<sup>^</sup>, C. Cuccurullo<sup>^</sup>, F. Cuccurullo<sup>^</sup> B. El-Zohbi\* A. Allegrini<sup>^</sup>, A. Mezzetti<sup>^</sup>, S. Martinotti\*<sup>^</sup>

\*Laboratorio Patologia Clinica II Policlinico Universitario "SS. Annunziata" Chieti; <sup>^</sup> Università degli Studi e Fondazione CeSI "G. D'Annunzio"

*Scopo del Lavoro.* Le malattie cardiovascolari costituiscono la più frequente causa di morte in tutti i paesi occidentali compresa l'Italia. Le complicanze delle coronaropatie e arteriopatie cerebrali comportano gravi invalidità nonché alti costi della spesa sanitaria. Di qui, la necessità di una strategia di prevenzione cardiovascolare attraverso l'utilizzo di indagini molecolari predittive. Sebbene COX2, un enzima coinvolto nel ciclo dell'acido arachidonico, sia universalmente accettato come modulatore della flogosi, ci sono prove consistenti che suggeriscono come COX2 svolga altri ruoli, incluso quello antitrombotico. Molti geni indotti durante l'infiammazione, hanno variazioni nucleotidiche polimorfiche nelle regioni promoter che ne modulano la trascrizione. Si ipotizza che tali modificazioni possano indurre una "deregulation" del gene le cui modificazioni di espressione hanno ripercussioni di rilevanza clinica. Il nostro progetto è incentrato al design di un test molecolare predittivo per le patologie multifattoriali ed in particolare quelle cardiovascolari, capace di identificare il polimorfismo -765 G>C del promotore del gene COX2. Tale variante correla con una maggiore stabilità della placca aterosclerotica.

*Materiali e Metodi.* Lo studio è stato condotto tra marzo 2002 ed ottobre 2003. Due i gruppi di pazienti studiati e reclutati nei centri Universitari di Chieti, Pisa, Roma, Palermo. Il primo di 864 pazienti, ricoverati, che avevano avuto un primo episodio di infarto del miocardio o ictus ischemico. L'altro, di 577 individui ricoverati, che non manifestavano nessuna patologia acuta cardiovascolare o cerebrale. È stato progettato e brevettato un kit molecolare con metodologia PCR classica: product size (bp)231, primers COX2F -884 -865, COX2R -654 -674 RFLP: FAUI 2U/μl con pattern di restrizione (wt/mut) bp 231-bp124-bp107

*Risultati.* Abbiamo trovato che il polimorfismo -765 G>C del gene COX2 è associato alla riduzione di rischio statisticamente significativa (Odds ratio GC 0.45 CC 0.34) di infarto del miocardio o ictus ischemico. Ciò porta a dedurre che questa variazione genetica possa essere utilizzato per la selezione di pazienti a rischio di eventi clinici attribuibili alla rottura di placche.

*Conclusioni.* La sintesi di questo studio mira a proporre un kit molecolare per predire il rischio cardiovascolare. Ciò è in relazione ad una diminuita trascrizione genica che influenza la minor espressione di metalloproteinasi, come importanti elementi di instabilità della placca aterosclerotica.

### STUDIO DI MARCATORI SIEROLOGICI IN PAZIENTI DISPEPTICI

C-09

B. Germanà<sup>2</sup>, M. Battistel<sup>°</sup>, G. Bertiato<sup>°</sup>, P. Caruana<sup>4</sup>, M. Forni<sup>°</sup>, A. Franzè<sup>1</sup>, P. Lecis<sup>2</sup>, N. Papa<sup>°</sup>, F. Di Mario<sup>3</sup>

1 Gastroenterologia Università di Parma, 2 Ospedale di Belluno, 3 Ospedale di Parma; <sup>°</sup> Laboratorio Ospedale di Belluno, Istituto di Patologia Università di Parma

*Introduzione.* Si ritiene che circa il 25-40% della popolazione presenti problemi di dispepsia spesso riconducibili a infezione da Helicobacter pylori (Hp). Per la valutazione della dispepsia viene comunemente utilizzata la gastroscopia e la ricerca di infezione da Hp. La determinazione di marcatori non invasivi è stata di recente suggerita per valutare lo stato morfologico e funzionale della mucosa gastrica

*Scopo del Lavoro.* Lo studio si è proposto di valutare l'accuratezza di un pannello di test sierologici (Panel) non invasivi (PGI, PGII, G-17 e IgG-Hp) come screening di pazienti con sintomi dispeptici.

*Pazienti e metodi.* I pazienti sono stati arruolati dai medici di famiglia di Belluno e Parma che preventivamente istruiti, hanno inviato i pazienti dispeptici ai rispettivi centri di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva. In totale sono stati arruolati 362 pazienti (208 femmine; range età 18-88 anni) tra maggio ed ottobre del 2003. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a prelievo di sangue per il dosaggio del panel e gastroscopia con biopsie multiple. La eventuale gastrite è stata classificata secondo la Sydney classification System. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con il test di Mann-Whitney rank-sum

*Risultati.* Dallo studio sono stati eliminati 75 pazienti in terapia con inibitori della pompa protonica; dei rimanenti 287, 132 risultarono positivi all'Hp. In questi ultimi i livelli medi dei marcatori (sPGI 20.6±63.2mcg/l, sPGII 15.9±1 mcg/l, IgG anti-Hp 73.1±32.6 UI) risultarono sempre maggiori rispetto agli Hp negativi (p<0.001). Non si è evidenziata differenza statisticamente significativa per la sG-17. All'analisi istologica 138 pazienti risultarono con mucosa gastrica normale, 89 risultarono con gastrite cronica non atrofica (NACG) e 60 con gastrite cronica atrofica (ACG). Il gruppo NACG aveva livelli dei marcatori sierici sempre più alti del gruppo con mucosa normale e questo valeva anche per il gruppo ACG (p<0.001 per tutte le determinazioni). Inoltre le ACG avevano livelli medi di IgG anti-Hp, sPGI e rapporto sPGI/sPGII sempre inferiori rispetto alle NACG (p<0.05). I livelli di pepsinogeno erano più alti nei soggetti Hp positivi, mentre il rapporto sPGI/SPGII risultava minore. La sensibilità e specificità nell'individuare l'infezione da Hp delle IgG anti-Hp era rispettivamente del 85% e 79%, inoltre alti livelli dei pepsinogeni, in particolare sPGII, associati ad alti livelli delle IgG anti-Hp correlava con la presenza di gastrite cronica. I pazienti con maggiore età si collocavano nel gruppo delle ACG in cui la prevalenza dell'infezione da Hp era circa del 60%, con associato un alto titolo anticorpale indicante un'infezione radicata da lungo tempo. I livelli di sG-17 sono risultati essere un ottimo marcatore per la gastrite atrofica antrale, e gli elevati dosaggi del pepsinogeno e delle IgG anti-Hp hanno confermato una infezione attiva da Hp. I pazienti con atrofia gastrica multifocale avevano livelli più alti di sPGI e sG-17.

*Discussione.* L'analisi dei pepsinogeni sierici e delle IgG anti-Hp si è dimostrata utile nella ricerca delle infezioni da Hp e nella classificazione delle gastriti. I pazienti con sierologia negativa potranno essere trattati in maniera sintomatica senza ricorrere a test invasivi come la gastroscopia, che invece andrà riservata ai casi che dopo trattamento eradicante per la gastrite Hp positiva continueranno a manifestare sintomi dispeptici o nei casi in cui il panel metta in rilievo potenziali gastriti a rischio.

**EFFETTI DEL POLIMORFISMO -174 G>C DELL'INTERLEUCHINA-6  
SULL'INSULINOESISTENZA IN SOGGETTI SANI ED AFFETTI DA DIABETE DI TIPO 2**

C-10

**R. Testa 1, F. Olivieri 1, AR. Bonfigli 1, C. Sirolla 1, M. Boemi 1, F. Marchegiani 1, M. Marra 1, S. Cenerelli 1, R. Antonicelli 1, A. Dolci 2, G. Paolisso 3, I. Maccaroni 4, F. Panicari 4, C. Franceschi 1**

1 Istituto Nazionale Ricovero e Cura per Anziani, INRCA-IRCCS, Ancona 2 Dipartimento di Patologia, MultiMedica, Milano, 3 Dipartimento di Malattie Geriatriche e Metaboliche, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli, 4 Laboratorio Analisi, Ospedale di Recanati

*Scopo del lavoro:* L'interleuchina-6 è un potente mediatore dell'infiammazione e gioca un ruolo importante sia nella patogenesi dell'insulinoresistenza che del diabete di tipo 2. Recentemente, il polimorfismo del promoter alla posizione -174 (G>C) è stato dimostrato essere associato al livello di insulino sensibilità, ma altri risultati sembrano essere in contrasto con tale affermazione.

*Materiali e metodi:* per chiarire tali aspetti, 145 soggetti diabetici di tipo 2 senza complicanze diabetiche e 139 soggetti sani appaiati per sesso e per età sono stati studiati genotipicamente e fenotipicamente per IL-6, insulino resistenza (HOMA) e per i principali parametri legati all'insulino resistenza.

*Risultati:* I soggetti sani i C+ carriers (genotipi CG+CC) hanno insulina basale ed insulino resistenza più basse rispetto ai C- carriers (genotipo GG) ( $p<0.05$ ). I soggetti sani C+ carriers inoltre mostrano una correlazione significativa tra IL-6 ed HOMA, insulinemia basale, HDL e fibrinogeno ( $p<0.05$ ) mentre nei soggetti diabetici C+ carriers la IL-6 correla con BMI, HbA1c, insulinemia basale, HOMA, PCR e PAI-1 ( $p<0.05$ ). Correggendo le correlazioni significative dei C+ carriers per l'effetto del BMI, si evidenzia il BMI ha un effetto gene dipendente sull'azione dell'insulina. I soggetti C- carriers non mostrano invece alcuna correlazione significativa tra i livelli di IL-6 e i parametri considerati nello studio.

*Discussione e conclusioni:* i nostri risultati dimostrano che il polimorfismo -174 G>C dell'IL-6 è associato all'insulinoresistenza e permette di discriminare due popolazioni nelle quali l'azione dell'insulina sembra avere una differente sensibilità ai livelli di IL-6. Ciò potrebbe comportare un diverso approccio farmacologico a seconda del polimorfismo -174 G>C dell'IL-6 nel trattamento dell' insulinoresistenza.

**IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO FISIOPATOLOGICO DI PARTNERS MOLECOLARI  
DI SGK1 E POSSIBILI IMPLICAZIONI CLINICHE**

C-11

**M. Menniti, R. Iuliano, R. Amato, E. Gulletta, N. Perrotti**

DMCS, Università Magna Graecia, Catanzaro

*Scopo del lavoro.* Il nostro progetto di ricerca è indirizzato ad identificare nuovi partners molecolari per SGK1, serin/treonin chinasi coinvolta nella regolazione del trasporto tubulare del sodio indotto da mineralcorticoidi, insulina e vasopressina.

*Materiali e Metodi.* Il gene codificante per SGK1 clonato in un adatto vettore (pBridge) è fatto esprimere in *S. Cerevisiae* ed utilizzato per esperimenti di mating con lieviti esprimenti library di rene umano. Sono state studiate: l'espressione di geni reporters e la successiva selezione di lieviti, nei quali SGK1 ha interagito con proteine espresse dalla library; l'interazione in vivo mediante coimmunoprecipitazione, dopo aver trasfettato cellule COS7 con vettori esprimenti le proteine interessate con appropriati epitopi (HA, Myc); la colocalizzazione mediante immunofluorescenza in microscopia confocale. Si è proceduto, infine, all'allestimento di saggio funzionale.

*Risultati.* Abbiamo dimostrato la specifica interazione fra SGK1 e PMM2 (Fosfomannomutasi tipo 2), enzima coinvolto nella regolazione della biosintesi di glicoproteine, necessario per la sintesi del GDP-mannosio, essenziale per la produzione di dolicol-pirofosfato-oligosaccaride. L'interazione è stata confermata in cellule intatte (COS7) mediante coimmunoprecipitazione e colocalizzazione di entrambi gli enzimi nella zona periplasmica. Siamo stati in grado di dimostrare in vivo, su immunoprecipitati, secondo il metodo di Van Schaftingen and Jaeken che l'attività enzimatica di PMM2 è regolata positivamente da insulina e negativamente da SGK1 sia in presenza sia in assenza di insulina, suggerendo un possibile coinvolgimento di SGK1 nella regolazione della glicosilazione.

*Discussione e Conclusioni.* L'osservazione che l'attività di PMM2 può essere regolata da insulina apre nuove prospettive sulla comprensione della fisiopatologia dei disordini congeniti della glicosilazione. I nostri risultati applicati alla patogenesi della Fibrosi cistica, potrebbero spiegare la mancanza dell'inibizione dell'assorbimento del sodio e l'iperviscosità delle secrezioni. Un aumento dell'espressione di SGK1 che, come abbiamo dimostrato, comporta la diminuzione della glicosilazione attraverso l'inibizione dell'attività di PMM2, è stato descritto in cellule epiteliali bronchiali di pazienti con fibrosi cistica, nei quali è presente anche l'incremento della suscettibilità alle infezioni batteriche. La regolazione dell'attività di PMM2 e della glicosilazione e la possibile implicazione di una chinasi, coinvolta nella traduzione di segnali di sopravvivenza dipendenti da siero e steroidi, può essere importante per i processi di adesione e di interazione cellulare, così come per lo sviluppo delle complicanze renali e dell'ipertensione.

## I MICROARRAYS NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE DELLE INFEZIONI VIRALI: VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE

C-12

**ML Modolo 1, C Lauterio 2, D Villalta 1**

1 Immunologia Clinica e Virologia, DML, A.O. "S.Maria degli Angeli", Pordenone; 2 BCS Biotech, Cagliari

*Scopo del lavoro.* La determinazione non solo accurata, ma anche rapida di patogeni responsabili di infezioni respiratorie, fa sì che i protocolli basati sulla tecnica microarray, in grado di rilevare contemporaneamente e in breve tempo diversi agenti patogeni, rappresentino un sistema analitico ideale per tali infezioni. Scopo del nostro studio è stato valutare la sensibilità e la specificità analitica di un biochip commerciale in grado di rilevare contemporaneamente 8 virus respiratori.

*Materiali e Metodi.* Sono stati testati 50 campioni, simulanti materiale clinico, appartenenti al programma pilota di valutazione esterna di qualità organizzato dal Quality Control for Molecular Diagnostics (Glasgow-Scotland), suddivisi in 6 diversi pannelli comprendenti virus Influenza A & B, Parainfluenza 1 & 3, Virus Respiratorio Sinciziale (RSV) e Metapneumovirus umano (hMPV), Rhinovirus 16,72 & 90, Adenovirus 4 & 7, Coronavirus 229E & OC43, con campioni negativi e positivi a 3 diverse concentrazioni virali definite dal laboratorio di riferimento. Materiali (BCS Biotech S.p.A.): Viral Nucleic Acid Kit per estrazione acido nucleico (DNA e RNA), BCS RV IVD Kit per retrotrascrizione - amplificazione del DNA (multiplex-PCR): la miscela di reazione contiene coppie di primers per i virus dell'influenza A e B, Parainfluenza 1, 2, 3, RSV, Adenovirus e SARS-Coronavirus. BCS RV Chip per la rivelazione, mediante ibridazione con sonde specifiche adese ad un supporto di polimeri organici.

*Risultati.* I 3 campioni hMPV e tutti quelli contenenti Rhinovirus e Coronavirus-non SARS sono risultati negativi, come peraltro atteso, dal momento che i primers per questi virus non erano presenti nel sistema da noi provato. Ambedue i virus influenzali sono stati identificati e il B fino alla diluizione più elevata; in un campione è stata dimostrata la presenza contemporanea del virus influenzale A e B. Mentre il virus parainfluenzale 3 è stato rilevato nei 2 campioni a carica più elevata, il parainfluenzale 1 non è stato identificato in nessuno dei 3 campioni positivi, è stato rilevato invece, assieme al parainfluenza 3, nel campione che contiene i due virus. La presenza del virus RSV è stata dimostrata nel campione a maggiore concentrazione. L'Adenovirus 4 è stato evidenziato nei 2 campioni a carica più elevata, invece il tipo 7 non è stato rilevato in nessuna delle tre diluizioni. Tutti i campioni negativi per i virus influenzali, parainfluenzali, RSV e adenovirus sono risultati negativi.

*Discussione e Conclusioni.* La nostra esperienza con RV Chip (BCS Biotech S.p.A.) ha permesso di apprezzare i vantaggi del metodo: estrazione degli acidi nucleici unica per virus a DNA e virus a RNA, amplificazione contemporanea di più virus (multiplex-RT-PCR), rilevazione mediante biochip semplice da eseguire e da interpretare (BCS AiM Reader) anche in caso di copresenza di 2 diversi virus, e infine risultati disponibili in giornata. Il confronto con il laboratorio di riferimento ha verificato che il metodo è specifico e, anche se meno sensibile di taluni metodi tradizionali nested-PCR, presenta comunque una sensibilità idonea ad un utilizzo clinico in caso di sindrome respiratoria acuta.

## APPROCCIO PROTEOMICO ALLO STUDIO DI UN MODELLO ANIMALE DI MORBO DI PARKINSON

C-13

**A. De Iuliis 1, J. Grigoletto1, A. Recchia 2, P. Arslan 1**

1 Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali; 2 Dipartimento di Anestesiologia e Farmacologia Università degli Studi di Padova

*Scopo del lavoro.* Il morbo di Parkinson è la malattia neurodegenerativa più largamente diffusa, dopo il morbo di Alzheimer, ad eziologia ancora sconosciuta, il cui reperto autoptico caratteristico è il mesencefalo atrofico per perdita dei neuroni nigrostriatali. In un tentativo di identificare alcune delle proteine che possano essere associate al processo di morte neuronale dopaminergica, ci siamo avvalsi delle tecniche analitiche fornite dalla proteomica, per analizzare un modello animale di morbo di Parkinson.

*Materiali e Metodi.* Il modello animale di morbo di Parkinson è stato ottenuto iniettando stereotassicamente la substantia nigra destra di ratti con 6-idrossidopamina (6-OHDA), tossina che determina stress ossidativo e pertanto neurodegenerazione, mantenendo la substantia nigra controlaterale come controllo (ratti emiparkinsoniani). Campioni di tessuto di substantia nigra e di striato sono stati dissezionati da 5 ratti emiparkinsoniani, risultati positivi al test comportamentale con apomorfina, e successivamente omogenati. La miscela di proteine, presenti negli omogenati di tessuto, è stata solubilizzata mediante tampone contenente urea, chaps e tiourea. La separazione in prima dimensione delle proteine è stata condotta mediante isoelettrofocalizzazione, utilizzando gradienti di pH compresi tra 4 e 7 e 5 ed 8, rispettivamente per il tessuto di substantia nigra e di striato. Risolti in SDS-PAGE, i profili proteici dei tessuti di substantia nigra e di striato, indotti alla neurodegenerazione, sono stati messi a confronto con i rispettivi controlli di tessuto sano controlaterale. L'analisi è stata effettuata mediante il software di analisi d'immagine PDQuest (Bio-Rad).

*Risultati.* Un protocollo di estrazione e solubilizzazione delle proteine è stato messo a punto per il tessuto cerebrale, al fine di ottenere una soddisfacente risoluzione del corredo proteico, mediante separazione in doppia dimensione. L'analisi d'immagine ci ha permesso di individuare 3 spot proteici presenti nel tessuto di substantia nigra trattato con 6-OHDA, ma non nel suo controllo, e 2 spot proteici presenti nel profilo dello striato lesionato e non in quello normale. Tali spot sono ora all'esame mediante spettrometria di massa (MALDI-TOF), per l'identificazione della sequenza aminoacidica.

*Discussione e conclusioni.* Sono state individuate significative differenze di espressione in alcune delle proteine presenti nei profili proteici di tessuto di substantia nigra e di striato, indotti alla neurodegenerazione, rispetto ai rispettivi controlli. Tali proteine, che saranno identificate in spettrometria di massa, potrebbero essere coinvolte nel processo di morte neuronale dopaminergica.

**ECM NEL DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA CLINICA, IMPATTO ED ANALISI DEGLI SVILUPPI DI UN PROGETTO FORMATIVO****C-14****L. Penzo, S. Valverde, O. Boscolo, G. Gessoni**

*Scopo del lavoro:* L'ECM prevede l'obbligatorietà della formazione continua ed è rivolta a tutti gli operatori della Sanità, coinvolgendo tutte le categorie professionali del ruolo sanitario. La misura dell'impegno (valutata in crediti formativi) che ognuno deve dedicare annualmente all'aggiornamento ed al miglioramento qualitativo del proprio lavoro, è riferita al quinquennio 2002-2006.

*Scopo del lavoro* è valutare l'impatto che questo ha avuto nel D.P.C. e l'imput che da esso ne è derivato. *Materiale e Metodi:* All'interno della Medicina di Laboratorio è stato costituito un "Punto ECM" (in uno spazio dedicato), con riviste, CD audiovisivi multimediali, postazione PC, collegamento web in rete Intranet ed Internet; nel contempo si è organizzato un progetto formativo aziendale coinvolgendo tutte le figure sanitarie delle U.O. del Dipartimento (Medicina di Laboratorio, Centro Trasfusionale, Anatomia Patologica) dei due ospedali di Chioggia e Piove di Sacco. Il pfa si è svolto in orario pomeridiano, dalle 14.45 alle 18.45, ed ha riguardato tematiche varie con l'obiettivo delle linee guida come fondamento.

*Risultati:* Lo sviluppo del PFA e gli interventi programmati ha costituito la base per: una rilettura del lavoro ordinario, coinvolgimento di Personale sia nella preparazione delle relazioni, sia nella verifica di quanto discusso far parlare i tecnici ai tecnici, mettendo a confronto esperienze e dati l'attivazione di incontri preparatori ha premesso di sviscerare alcuni lati negativi ed immettere nuove energie e stimoli. Al termine di ogni incontro, con ADF, un vivace dibattito ha concluso l'incontro. Il questionario valutativo è stato svolto da tutti i partecipanti.

*Discussione e conclusioni:* Le risposte del questionario hanno evidenziato la reale necessità di questi impegni, ci sono stati TSLB che si sono fatti avanti e che vogliono partecipare attivamente con relazioni ed interventi ai prossimi impegni. Inoltre si è convenuto che a questi impegni debba seguire parallelamente anche un lavoro di comunicazione e di apertura delle nostre attività sia verso l'interno sia all'esterno, agli altri soggetti sanitari, alle società scientifiche. Una riunione in tal senso si è già avuta con l'area critica e dell'emergenza (PS, Rianimazione) per un monitoraggio delle criticità e di interventi migliorativi delle linee guida.

In conclusione possiamo dire che l'ECM è stata la molla che ha acceso non solo la ricerca di punti o bollini formativi, ma anche un'occasione di stimolo, di dibattito e di crescita professionale, di presenza e di comunicazione. Ci siamo rimessi in gioco, rivalutando il nostro impegno e lavoro, rivedendo lati critici. La modernizzazione del Laboratorio deve passare anche attraverso una formazione continua, indispensabile per saper, fare, essere, protagonisti in una Sanità.

**VALUTAZIONE DI ALCUNI MARKERS BIOCHIMICI RILEVATI NEL FOLLOW-UP DI PAZIENTI MASTECTOMIZZATE PER CARCINOMA DELLA MAMMELLA****D-01****MR. Metelli, F. Fulceri, F. Manzone, C. Domenichini, C. Puccetti, E. Panicucci, P. Pietrini**

U.O. Analisi Chimico Cliniche Specializzate, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana

*Scopo del lavoro.* Lo scopo dello studio è stato quello di monitorare i livelli di alcuni marcatori biochimici "tumorali" utilizzati, nell'ambito della neoplasia mammaria maligna, nella sorveglianza delle pazienti radicalmente trattate e nel monitoraggio delle terapie antineoplastiche, al fine di fornire utili informazioni circa l'estensione clinica della malattia tumorale, e facendo assumere a tali marcatori un significato prognostico. I marcatori testati sono due mucine, l'antigene carcinoembrionario (CEA) ed il CA 15.3, l'antigene polipeptidico tissutale (TPA) e due molecole utilizzate per la valutazione del turnover osseo quali l'isoenzima osseo della fosfatasi alcalina (ALP-B) e l'aminoacido desossipiridinolina (DPD).

*Materiali e metodi.* Lo studio è stato condotto su campioni di sangue prelevati in sessantuno pazienti di età compresa tra 31 e 83 anni ( $60 \pm 11$ ,  $m \pm SD$ ), operate per carcinoma della mammella. Quarantuno pazienti erano libere da malattia e venti presentavano metastasi, 15 metastasi ossee e 5 metastasi in sedi diverse, in trattamento terapeutico con risposta parziale o completa. Per tutte le pazienti i prelievi di sangue ed urina sono stati eseguiti in tempi diversi per un anno, per le pazienti metastatiche sia in periodi in cui erano sottoposte alla terapia che negli intervalli. Per il CEA, CA 15.3 il dosaggio è stato effettuato su campioni di siero con metodo immunoenzimatico a cattura di microparticelle (MEIA), per il TPA e ALPB su siero con metodo ELISA, e per la DPD su spot di urine delle prime due ore del mattino con metodo ELISA, ed il valore viene rapportato al dato della creatinuria presente nel campione. Il dosaggio della creatinina è stato effettuato con il metodo di Jaffè.

*Risultati.* Lo studio ha valutato i livelli sierici dei marcatori tumorali CEA, Ca15.3 e TPA e dei marcatori biochimici del turnover osseo ALPB e DPD nell'arco di un anno senza registrare tra i campioni valutati al tempo (To) (primo prelievo) ed al tempo (Tf) (ultimo prelievo) variazioni statisticamente significative nello stesso paziente. Nella valutazione del comportamento delle molecole in studio si sono evidenziate delle differenze statisticamente significative che vengono descritte qui di seguito riportando come primo dato i livelli medi riscontrati nelle pazienti libere da malattia e come secondo dato i livelli medi riscontrati nelle pazienti metastatiche. Per il Ca 15.3 si è evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i livelli del marker riscontrati tra i due gruppi di pazienti sia al To ( $15.6$  vs  $120.5$  U/ml, test t per campioni indipendenti =  $2.275$ ,  $p = 0.034$ ) che al Tf ( $13.2$  vs  $208.4$  U/ml, test t per campioni indipendenti =  $2.070$ ,  $p = 0.052$ ). Per l'antigene polipeptidico tissutale (TPA) i dati ottenuti hanno presentato una differenza statisticamente significativa sia al To ( $123$  vs  $404$  ng/ml, test t per campioni indipendenti =  $2.389$ ,  $p = 0.026$ ) che al Tf ( $111$  vs  $707$  ng/ml, test t per campioni indipendenti =  $3.070$ ,  $p = 0.006$ ). Per la DPD la differenza statisticamente significativa si è resa evidente sia al To ( $5.8$  vs  $9.1$  nM DPD/mM Cr, test t per campioni indipendenti =  $2.05$ ,  $p = 0.05$ ) che al Tf ( $7.1$  vs  $10.1$  nM DPD/ mM Cr, test t per campioni indipendenti =  $2.13$ ,  $p = 0.04$ ). Per il dosaggio dell'antigene carcino-embriionario (CEA) e dell'ALP-B non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i due gruppi considerati sia al To che al Tf.

*Discussione e conclusioni.* Questi risultati ci indicano che i livelli dei marker testati possono essere indici di malattia. Non aver rilevato nell'arco di un anno nessun caso che sia passato da un gruppo all'altro delle pazienti non ha consentito di esprimere una maggior sensibilità per un marker rispetto ad un altro. Lo studio necessita di continuità al fine di poter valutare il comportamento delle molecole considerate nelle fasi precoci di metastatizzazione.