

Riassunti delle Comunicazioni Poster e delle Comunicazioni Selezionate

GRUPPO A:	Diagnostica ematologica	A-01 - A-21	121
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	A-22	131
	Diagnostica della coagulazione	A-23 - A-32	132
	Diagnostica del sistema nervoso centrale	A-33 - A-35	137
GRUPPO B:	Diagnostica immunologica	B-01 - B-15	138
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	B-16	146
	Diagnostica nelle infiammazioni	B-17 - B-22	146
	Diagnostica allergologica	B-23 - B-26	149
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	B-27	151
GRUPPO C:	Malattie genetiche	C-01	152
	Medicina Molecolare	C-02	152
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	C-03	153
	Biologia molecolare	C-04 - C-15	153
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	C-16	159
GRUPPO D:	Indicatori di neoplasia	D-01 - D-03	160
	Indicatori di lesione d'organo	D-04 - D-07	161
	Indicatori di metabolismo osseo	D-08	163
	Evidence Based Medicine	D-09 - D-10	164

GRUPPO E:	Diagnostica microbiologica	E-01 - E-12	165
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	<i>E-13</i>	171
GRUPPO F:	Biochimica e patologia cellulare	F-01 - F-04	171
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	<i>F-05</i>	173
	Enzimi - Ormoni - Proteine - Lipidi - Lipoproteine	F-06 - F-14	174
	Malattie metaboliche	F-15 - F-20	178
GRUPPO G:	Automazione	G-01 - G-02	181
	Organizzazione - Gestione	G-03 - G-17	182
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	<i>G-18</i>	190
GRUPPO H:	Qualità - Accreditamento - Certificazione	H-01 - H-04	190
	<i>Comunicazioni Selezionate</i>	<i>H-05 - H-06</i>	192
	Standardizzazione – Controllo di Qualità	H-07 - H-08	193
	Valutazione metodi	H-09 - H-17	194
	Valutazione sistemi	H-18 - H-20	199

RIASSUNTI DELLE COMUNICAZIONI POSTER SEGNALATI ALL'EDITORIAL BOARD

GRUPPO A:	A-01, A-02, A-05, A-07, A-13, A-16, A-19, A-20, A-23, A-24, A-27, A-29, A-31
GRUPPO B:	B-02, B-05, B-09, B-12, B-13, B-17, B-18
GRUPPO C:	C-01, C-02, C-04, C-05, C-06, C-08, C-10, C-14
GRUPPO D:	D-02, D-06, D-07, D-08
GRUPPO E:	E-07, E-09, E-10, E-11
GRUPPO F:	F-01, F-02, F-13, F-16, F-19
GRUPPO G:	G-13, G-16
GRUPPO H:	H-03, H-07, H-09, H-10

LA CITOMETRIA AUTOMATIZZATA NELLO STUDIO DELLE PIASTRINE**A-01****Silvestri M.G., D'Atena T., Covili Faggioli G., Miniero R., Bonetti M., Lamedica R., Beltrandi E., Sarma M., Bassi M., Romboli M.**

U.O. Pat. Clinica, Az. Ospedaliero-Universitaria Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna

Scopo del lavoro. Un intervento terapeutico appropriato è legato alla precisione e all'accuratezza del conteggio piastrinico. Le problematiche della Citometria sono dovute alla necessità d' identificare correttamente le grandi piastrine da altri elementi dello stesso volume.

Il metodo di riferimento è il citofluorimetrico con anticorpi monoclonali CD41 e CD61 (1).

Materiali e Metodi. Nello studio sono stati considerati 164 casi: 18 campioni di riferimento, 57 con piastrinopenie da aplasia, 89 con disordini da consumo. È stato eseguito il conteggio delle Piastrine con contaglobuli ADVIA120 BAYER, COULTER, citofluorimetro (FACSCAN) a due anticorpi monoclonali CD41 FITC e CD61 PE e valutazione dello striscio periferico. I dati sono stati elaborati con EXCEL, l' analisi della regressione, la correlazione (r) e il Test T per dati accoppiati. I risultati dei tre metodi sono stati correlati con alcuni parametri relativi alla morfologia delle PLT e RBC forniti dall' ADVIA120 (MPV, MPM, MPC, L-PLT, RBC-F, RBC-G, PLT-CLM, RBC-MICRO).

Risultati. Sono state prese in considerazione le medie dei tre metodi: nel totale dei casi e nei singoli gruppi di patologie il metodo citofluorimetrico dà conteggi superiori rispetto ai conteggi automatizzati. Sono state analizzate le differenze positive e negative tra i metodi, in funzione dei flags e indicatori di sospetto di patologia forniti dal software dell' ADVIA120: nelle piastrinopenie da consumo nei casi in cui l' ADVIA120 dà conteggi superiori al COULTER c'è correlazione con la presenza di grandi piastrine L-PLT, con MPV e con MPM, nei casi in cui il COULTER dà conteggi superiori all' ADVIA120 c'è correlazione con i frammenti eritrocitari RBC-F, con MPV e con la percentuale dei microciti RBC-MICRO; nelle piastrinopenie delle aplasie, nei casi in cui il citofluorimetro dà conteggi superiori all' ADVIA c'è correlazione con L-PLT, MPV, MPC e MPM.

Discussione e conclusione. Il metodo più attendibile è il citofluorimetrico, l' ADVIA120 mostra ottima correlazione in tutti i casi considerati, in particolare nei disordini da consumo (R 0.96). Le differenze significative tra ADVIA120 e Citofluorimetro sono correlate alla presenza di L-PLT. L' osservazione d' istogrammi, citogrammi e dei flags di sospetto di patologia forniti dall' ADVIA120, possono essere considerati indicatori immediati in talune situazioni di emergenza, e dirimere il dubbio tra piastrinopenia da consumo e da aplasia e/o infiltrato midollare.

(1) Platelet counting by the RBC/Platelet Ratio method. A Reference method. International Council for Standardization in Haematology. Am J Clin Pathol 2001;115:460-464.

ANTIBIOTICORESISTENZA DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN PAZIENTI OSPEDALIZZATI, COMUNITARI ED ISTITUZIONALIZZATI**A-02****Pirali F., Pirali F.***

Lab. Patologia Clinica, Ospedale S.Orsola Fatebenefratelli, Brescia * Cattedra di Igiene, Università degli Studi di Brescia.

Scopo del lavoro: abbiamo voluto verificare il grado di resistenza agli antibiotici di Pseudomonas aeruginosa isolati nell' anno 2004 da pazienti ricoverati presso l' Ospedale S.Orsola Fatebenefratelli di Brescia, di circa 400 posti letto, in pazienti ambulatoriali ed in pazienti istituzionalizzati in Istituti per malati psichiatrici o case di riposo geriatriche i cui campioni clinici per indagini microbiologiche afferivano al Laboratorio di Patologia Clinica dell' Ospedale S.Orsola stesso.

Materiali e Metodi: i campioni clinici sono stati seminati in agar sangue ed agar di Mc Conkey e le colonie identificate con tests biochimici e sottoposte a tests di sensibilità agli antibiotici con il sistema Sceptor (BD). E' stata valutata la differenza di sensibilità agli antibiotici tra i tre gruppi di pazienti con l' applicazione del test esatto di Fisher.

Risultati: sono stati isolati ed identificati 85 ceppi di Pseudomonas aeruginosa: 37 da pazienti ospedalizzati, 20 da pazienti comunitari, 28 da pazienti istituzionalizzati. Le percentuali di sensibilità agli antibiotici variavano dal 29% per ofloxacina allo 86% per amikacina negli ospedalizzati; dal 60% per aztreonam al 100% per carbenicillina nei pazienti comunitari; dal 40% per ofloxacina al 96% per amikacina nei pazienti istituzionalizzati. Per carbenicillina, gentamicina, imipenem, netilmicina, tobramicina, ofloxacina le differenze di sensibilità tra ospedalizzati e comunitari sono risultate statisticamente significative ($p < 0,05$); per carbenicillina, gentamicina, tobramicina, ofloxacina le differenze tra istituzionalizzati e comunitari sono risultate statisticamente significative, mentre non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra pazienti ospedalizzati ed istituzionalizzati.

Discussione e Conclusioni: Pseudomonas aeruginosa ha presentato frequenti resistenze agli antibiotici, anche se differenti in relazione alle origini di tale microrganismo. I ceppi ospedalieri risultano più resistenti rispetto a quelli comunitari ed i ceppi dei pazienti istituzionalizzati si collocano tra i due gruppi descritti, ma molto vicini a quelli ospedalieri. Viene confermato che la resistenza di Pseudomonas aeruginosa è un problema tipicamente ospedaliero sul quale si deve continuare ad esercitare una attenta sorveglianza attraverso un più accorta politica ed igiene dell' uso degli antibiotici in Ospedale. Per ora il problema delle resistenze non sembra riguardare direttamente l' ambito comunitario, anche se il sempre più frequente passaggio di pazienti dall' ospedale per acuti, ai reparti riabilitativi, ai day hospital e day surgery alla assistenza domiciliare integrata etc. lascia ipotizzare la futura comparsa di resistenze anche in comunità.

DATI PRELIMINARI: FENOTIPIZZAZIONE LINFOCITARIA IN 2 SPELEOLOGI D'ELITE**A-03****Piccinini C.****, **Stenner E.***, **Gianoli E.****, **Perossa G.****, **Biasioli B.****

*Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica, Università di Padova **Dipartimento di Medicina di Laboratorio - Azienda Ospedaliera Universitaria, Trieste

Scopo del lavoro. Negli ultimi anni si è sviluppato molto l'interesse per lo studio della risposta del sistema immunologico all'attività fisica ed agli agenti "stressanti" psicofisici correlati. Poiché tali studi riguardano sport svolti in superficie, abbiamo voluto indagare la risposta del sistema immunitario in ambiente ipogeo.

Materiali e metodi. Sono stati eseguiti su 2 speleologi prelievi di sangue con il seguente protocollo: -la mattina (7am), prima di entrare in grotta, -dopo 1h 40' (-200m), -dopo 5h (fondo grotta -700m), - dopo circa 18h (in uscita) e -la mattina seguente (7am). I campioni di sangue sono stati conservati, durante la permanenza ipogea e prima della consegna al laboratorio, in un recipiente rigido a tenuta termica. Sono stati eseguiti: conteggio leuco-linfocitario (COULTER LH 750 ANALYZER ditta Beckman Coulter), valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie CD19, CD3, CD4, CD8, CD16, CD57 in citofluorimetria (COULTEREPICS XL.MCL Beckman Coulter).

Risultati. Durante la permanenza ipogea il numero assoluto dei linfociti totali e dei linfociti T (CD3, CD4, CD8) cala costantemente, in entrambi i soggetti, con andamento sinusoidale e con picco minimo all'uscita della cavità, al termine della risalita su corda di 700m (calo medio rispetto le condizioni basali: linfociti totali- 35%; CD3- 33%; CD4- 28%; CD8- 48%). L'andamento dei linfociti B (CD19) è simile anche se il valore minimo è riferito al prelievo eseguito in discesa, a circa 1h40' dall'ingresso (calo medio del 23%). Il comportamento dei linfociti NK (CD16, CD57), invece, evidenzia una marcata differenza intraindividuale; tuttavia, in entrambi, il valore minimo è stato misurato nel campione raccolto all'uscita della grotta (calo medio: CD16- 67%; CD57- 60%). Il numero assoluto dei linfociti totali e di tutte le sottopopolazioni esaminate, 24 ore dopo il termine della esplorazione, è risultato al di sotto dei valori basali iniziali (calo medio: linfociti totali- 29%; CD3- 32%; CD4- 32%; CD8- 30%, CD16- 22%, CD57- 32%, CD19- 38%).

Discussione e Conclusioni. I dati preliminari in nostro possesso, pur non permettendo definitive conclusioni, evidenziano, in accordo coi dati presenti in letteratura, un aumento dei globuli bianchi totali in seguito ad esercizio fisico d'endurance di lunga durata. L'andamento dei linfociti, invece, e delle sottopopolazioni linfocitarie da noi esaminate non è completamente comparabile con gli effetti di altri sport d'endurance di lunga durata svolti in superficie. Probabilmente l'ambiente sotterraneo rende questo sport molto aggressivo sul piano psicofisico e induce delle peculiari modificazioni che ci riproponiamo di approfondire nel prossimo futuro.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO DEGLI INDICI RETICOLOCITARI DEL SISTEMA SYSMEX XE-2100**A-04****Spina R.**, **Burrone G.**, **Cardillo A.**, **Galuppo M.**, **Lanati V.**, **Terulla V.**

Servizio Analisi Microbiologiche, IRCCS Policlinico San Matteo Pavia

Scopo del lavoro. Valutazione degli intervalli di riferimento dei parametri reticolocitari, in particolare dei nuovi indici RET-He, RBC-He e D-He, determinati da XE-2100 con software RET-Master.

Materiali e Metodi. Su 247 campioni di pazienti esterni (102 M, 145 F), età da 16 a 75 anni, Hgb>12,5 g/dL, senza allarmi strumentali, sono stati determinati gli intervalli di riferimento (range 2,5° - 97,5° percentile) e le differenze tra sesso con test di Kruskal-Wallis (significativa per p<0.01)

Risultati. Solo l'RPI (Indice di Produzione Reticolocitaria) ha valori diversi tra i due sessi. Ret-He (contenuto Hgb dei Reticolociti) ha valori superiori a RBC-He (contenuto Hgb degli RBC maturi) come dimostra il D-He (differenza tra RET-He e RBC-He) che in tutti i soggetti esaminati ha valori positivi.

Discussione e Conclusioni. La definizione degli I.R. indici reticolocitari è di particolare importanza essendo questi metodo dipendenti e, per gli indici di maturità, non confrontabili tra strumenti diversi. Gli I.R. da noi determinati per RET-He e RBC-He sono confrontabili agli I.R. di CHr e CH di Bayer descritti in letteratura. Il nostro interesse è rivolto in particolare al RET-He, unitamente al RBC-He e D-He, e al suo impiego nei pazienti con carenza funzionale di ferro.

	Tutti (n=247)		Maschi (n=102)		Femmine (n=145)		p-value (M/F)
	Mediana	Range	Mediana	Range	Mediana	Range	
RET %	0.93	0.49 – 1.98	0.88	0.51 – 2.00	0.95	0.47 – 2.04	0.1064
RET x10 ⁹ /L	43.80	22.10 – 91.82	45.00	26.01 – 98.55	43.60	20.56 – 94.02	0.6195
RET-He pg	32.60	29.53 – 35.02	32.77	30.61 – 35.14	32.55	29.30 – 34.78	0.1211
RBC-He pg	29.80	27.33 – 31.44	29.89	27.88 – 31.40	29.71	26.97 – 31.47	0.1647
D-He pg	2.91	1.51 – 4.13	2.92	1.50 – 4.17	2.84	1.51 – 4.16	0.1803
LFR %	94.60	85.02 – 98.95	94.55	84.70 – 98.48	94.60	84.91 – 99.17	0.6904
MFR %	5.10	1.05 – 12.73	4.85	1.51 – 13.05	5.10	0.66 – 12.66	0.7208
HFR %	0.30	0.00 – 2.28	0.30	0.00 – 2.24	0.30	0.00 – 2.37	0.5392
IRF %	5.40	1.05 – 15.00	5.45	1.51 – 15.30	5.40	0.83 – 15.09	0.6904
RPI%	0.80	0.40 – 1.70	0.90	0.50 – 2.05	0.80	0.30 – 1.70	<0.0001

CONTRIBUTO DELL'AUTOMAZIONE ALLO STUDIO DELLA MORFOLOGIA DISPLASTICA ATTRAVERSO NUOVI PARAMETRI STRUMENTALI

A-05

Cenci A.M., Casolari B.

Laboratorio Patologia Clinica, Nuovo Ospedale S. Agostino Estense, AUSL Modena.

Scopo del lavoro. E' stata valutata la possibilità di acquisire con l'ausilio dell'automazione informazioni e suggerimenti utili nello studio della particolare morfologia assunta dalle cellule in presenza di alterazioni displastiche, primitive o secondarie. *Materiali e Metodi.* 101 campioni per emocromo provenienti dalla routine di 4 stabilimenti ospedalieri sono stati esaminati con Sismex XE 2100. Lo strumento utilizza un sincretismo di differenti filosofie analitiche, tra cui la fluorescenza, per lo studio delle cellule ematiche. I dati presi in particolare considerazione sono stati i parametri posizionali NEUT-Y e NEUT-X, forniti in pagina di ricerca per ogni campione esaminato.

Risultati. Tutte le valutazioni sono state fatte considerando, come I.R., il range compreso tra il 2,5° e il 97,5° percentile di una popolazione considerata normale secondo la prassi comunemente applicata. In un primo gruppo di campioni, genericamente indicato come "displasie", 29 su 101 presentavano elementi immaturi (da Blasti a Metamielociti) senza note di disgranulopoiesi. Di questi, il 34% dei campioni con NEUT-X o NEUT-Y al di fuori degli I.R. presentavano una grande dispersione di valori, a volte al di sotto, altre al di sopra degli I.R. In un secondo gruppo, 65 campioni presentavano disgranulopoiesi di diverso grado (marcata, discreta, grave), 3 campioni Pseudo Pelger e 4 ipersegmentazione nucleare. In questo gruppo, l'80% dei campioni aveva NEUT-X e/o NEUT-Y al di fuori degli I.R. I risultati erano così distribuiti: il 100% con disgranulopoiesi marcata (9 su 9), l'84% con disgranulopoiesi discreta (31 su 37), il 58% con disgranulopoiesi lieve (11 su 19). Cellule Pseudo Pelger e Ipersegmentate mostravano comportamenti opposti: le pseudo-pelger valori NEUT-X e NEUT-Y sempre molto al di sotto degli I.R., le ipersegmentate valori NEUT-X e NEUT-Y sempre al di sopra degli I.R..

Discussione e Conclusioni. In presenza di displasia, i parametri posizionali NEUT-X e NEUT-Y si alterano in modo significativo in oltre l'80% dei casi. In particolare, il NEUT-X risulta direttamente correlato alla granularità, e inversamente correlato al rapporto N/C e alla complessità della forma nucleare e sembra diminuire al diminuire della granularità, e/o con la presenza di nuclei meno convoluti/picnotici. Il NEUT-Y correla direttamente con l'intensità di fluorescenza. L'aumento di quest'ultimo dato si lega alla presenza di elementi immaturi, ma i dati dimostrano che non è solo il livello di immaturità o il numero di immaturi a fornire valori "patologici" di NEUT-Y. Le asincronie di maturazione N/C, la disgranulopoiesi, l'immaturità nucleare spiegano l'eterogeneità di comportamento dei parametri posizionali e le diverse combinazioni con i quali questi si alterano.

AUMENTATA ESPRESSIONE DEL CD40-LIGAND (CD154) SULLE PIASTRINE DI PAZIENTI CON PORPORA TROMBOCITOPENICA AUTOIMMUNE (PTI)

A-06

Lobreglio G., Torsello R., Basile R., Panzera C., Pensa P.

U.O. di Patologia Clinica, Ospedale "Vito Fazzi", AUSL LE/1, Lecce

Scopo del lavoro. La PTI è un disordine immunologico caratterizzato dalla frequente presenza di autoanticorpi contro vari antigeni della superficie piastrinica. Evento critico della PTI è l'attivazione dei linfociti B da parte dei linfociti T CD4+ attivati; tale attivazione è mediata, tra l'altro, dal legame tra CD154 espresso sui linfociti T e il recettore CD40 sui B. CD154 è espresso anche nel citoplasma delle piastrine e può essere espresso sulla membrana in seguito ad attivazione. Lo scopo di questo lavoro è di valutare l'espressione del CD154 sulla membrana piastrinica nelle PTI, che potrebbe rappresentare una essenziale costimolazione dei linfociti B.

Materiali e metodi. Abbiamo studiato 28 pazienti affetti da PTI, con conta piastrinica $< 50 \times 10^9/L$, numero di megacariociti midollari normale o aumentato senza evidenze morfologiche di displasie, e nessun'altra condizione che potesse essere responsabile della trombocitopenia. Come controlli sono stati valutati 16 pazienti con trombocitopenia non immune (4 affetti da mielodisplasia, 9 da piastrinopenia postchemioterapica, 3 da cirrosi epatica) e 13 soggetti normali. Le piastrine, separate dal sangue periferico anticoagulato, sono state attivate con 0,5 U/ml di trombina per 5 minuti a 37°C, fissate con paraformaldeide 1%, marcate con MoAb anti CD154 PE ed analizzate al citofluorimetro; per ogni campione sono state analizzate sia piastrine attivate che non attivate

Risultati e conclusioni. L'analisi al CFM, eseguita con software CELLQUEST, ha evidenziato una aumentata espressione di CD154 sulla superficie delle piastrine attivate dei pazienti affetti da PTI (canale medio di fluorescenza: 380) rispetto alle piastrine di soggetti normali (CMF: 187) e di pazienti con trombocitopenie non immunologiche (CMF: 133); $p < 0.01$. La espressione del CD154 risultava aumentata anche sulle piastrine non attivate ma in modo statisticamente non significativo. L'aumentata espressione del CD154 sulle piastrine di pazienti con PTI potrebbe costituire una costimolazione essenziale nell'attivazione dei linfociti B autoreattivi contro potenziali target antigenici piastrinici.

UNA RETE DI LABORATORI ED OSPEDALI PER MIGLIORARE LA QUALITÀ DELLE PRESTAZIONI SANITARIE IN ITALIA. ESPERIENZA DEI CENTRI GIMEMA

A-07

Nanni M., Ariola C., DeCuia M. R., Derme V., Elia L., Ferranti G., Isidori R., Mancini F., Mascolo M. G., Pascucci B., Russo M. T., Scandone L., Stronati L., Tabacco F.
 DSLB-Lazio, Dip. B. C. E. La Sapienza-Roma

Scopo del Lavoro. Il Piano Sanitario Nazionale 2003-06 prevede il collegamento in rete di ospedali di riferimento con ospedali di distretto realizzando un sistema che possa fornire agli specialisti nuovi strumenti per una gestione integrata del paziente e la standardizzazione dell'iter diagnostico e terapeutico. L'ambizioso progetto comporta però una serie di limitazioni quali l'adeguamento tecnologico delle strutture sanitarie e la formazione del personale, non garantendo a tutti i pazienti un uguale livello di assistenza. Per superare queste difficoltà il Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto (GIMEMA) ha sperimentato in 3 anni un programma di centralizzazione di campioni biologici di pazienti adulti affetti da leucemia acuta linfoide.

Materiali e Metodi. Tale programma prevedeva l'invio di campioni di cellule di midollo osseo e/o sangue periferico di pazienti alla diagnosi ricoverati presso i centri GIMEMA per eseguire analisi specialistiche quali: immunologia, citogenetica, FISH, Southern blot, RT e Q-RT PCR, citofluorimetria. I campioni, spediti tramite corriere ai laboratori del Dip. di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia-Roma, erano in parte analizzati a Roma e in parte inviati in 4 Centri di eccellenza: Torino, Ferrara, Perugia, Napoli. Le risposte venivano quindi trasmesse al C. E. D. del GIMEMA e inserite in una cartella clinica digitale condivisa da tutti i centri. I pazienti venivano trattati in base alla caratterizzazione biologica secondo protocolli terapeutici standard.

Risultati. Sono stati centralizzati 414 campioni biologici, di cui 325 avevano un profilo genetico completo: citogenetica, FISH e Biologia Molecolare. Secondo tale profilo i pazienti sono stati classificati in 3 sottogruppi: pazienti privi di alterazioni genetiche, pazienti con t (9;22) BCR/ABL+, con t (4;11) ALL1/AF4+, con t (1;19) E2A/PBX1+, con delezione 9p/p15-p16, con del 6q, pazienti con anomalie strutturali e/o iperdiploidie. Sulla base di questa caratterizzazione è stato possibile identificare gruppi di pazienti con una differente prognosi: i pazienti senza anomalie o con del (9)p mostravano una prognosi favorevole e considerati quindi a basso rischio, i pazienti con t (9; 22), t (4;11) o t (1;19) mostravano una prognosi infausta e considerati ad alto rischio, i pazienti con del (6)q, differenti aberrazioni cromosomiche o cariotipo iperdiploide avevano un andamento clinico e un rischio intermedi. *Discussione e Conclusioni.* Tale suddivisione ha consentito di individuare differenti programmi terapeutici paziente-specifici. Questo programma è un esempio di perfetta integrazione tra specialisti e percorsi di approfondimento diagnostico che ha favorito il management del paziente oncologico, reso ottimale l'approccio terapeutico e offerto a tutti uguale assistenza.

ANALIZZATORE D'IMMAGINE CELLAVISION DM 96 E LEUCOCITOMETRIA DIFFERENZIALE

A-08

Buttarello M., Piva E., Temporin V., D'Altoe' P., Pajola R., Plebani M.

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-USL 16, Padova

Scopo del Lavoro. Il CellaVision DM 96 (Dasit, Milano) è un analizzatore d'immagine che raccoglie e preclassifica i leucociti a partire da uno striscio di sangue periferico colorato con MGG. La classificazione definitiva spetta invece all'operatore. Questo lavoro è stato condotto con lo scopo di verificare se l'uso del DM 96 possa ridurre la variabilità interosservatore nell'analisi di preparati normali e patologici.

Materiali e Metodi. Sono stati analizzati 20 campioni normali, 20 con basofilia e 20 con monocitosi. Per ciascun campione il conteggio è stato eseguito su 200 eventi complessivi, su strisci distinti, da parte di due diversi osservatori, sia su DM 96 che al microscopio secondo lo standard NCCLS H 20-A. La variabilità fra operatori è stata misurata su 3 citotipi (neutrofili, monociti, basofili), su ciascuno dei tre gruppi di campioni.

Risultati. Con DM 96 i CV per i neutrofili variano da 5.4 a 6.7 %; per i monociti da 10.5 al 30.5%; per i basofili da 20.9 a 90.0%. Con il metodo microscopico i CV per i neutrofili sono compresi fra 6.7 e 12.4%; per i monociti da 12.0 al 37.3%; per i basofili da 33.9 a 133.6%.

Discussione e Conclusione. I risultati ottenuti indicano una minore variabilità con l'uso del DM 96. Possibili spiegazioni: riduzione dell'errore distribuzionale (per maggior omogeneità del campo di lettura) e di identificazione (per la possibilità di confronto con altre cellule preclassificate e per la presenza dello zoom che consente ingrandimenti progressivi).

PARAMETRI POSIZIONALI DEL SISTEMA EMATOLOGICO COULTER SERIE LH-700: POSSIBILE IMPIEGO DIAGNOSTICO NELLE PATOLOGIE LINFOCITARIE

A-09

C. Scafuro

Laboratorio Patologia Clinica, Stab. Ospedaliero di Vibo Valentia

Scopo del lavoro: I sistemi ematologici Coulter Serie LH-700, oltre alla determinazione della formula leucocitaria, forniscono per tutti i campioni analizzati ulteriori 24 parametri posizionali relativi alle 4 principali popolazioni leucocitarie. Per ciascuna viene fornito il valore medio (Mean) ed il grado di eterogeneità (SD) delle misure di: volume cellulare (V), opacità/conduktività (C), scatter di luce laser (S). Scopo del lavoro era di valutare i parametri posizionali nelle patologie linfocitarie rispetto ai soggetti normali.

Materiale e metodi: con l'analizzatore LH-750 abbiamo eseguito gli emocromi sul sangue periferico raccolto in EDTA valutando, negli ultimi 6 mesi, le modificazioni dei parametri posizionali dei linfociti nei gruppi di pazienti con patologie linfocitarie, infettive o neoplastiche rispetto ad un gruppo di 500 campioni selezionati come normali per n° di linfociti e per l'assenza di allarmi morfologici.

Risultat.: I valori dei parametri posizionali dei linfociti reattivi, in apoptosi o nelle malattie linfoproliferative croniche, sono notevolmente differenti da quelli dei linfociti normali. La combinazione dei parametri relativi a volume e scatter di luce laser identificano diversi tipi di anomalie morfologiche che permettono l'identificazione di patologie. La popolazione linfocitaria delle B-LLC presenta un basso volume (Mean Vol LI=72) ed elevata eterogeneità volumetrica (SD V LI=23). Lo scatter di luce laser dei linfociti è diminuito rispetto ai valori normali (Mean S LI=59). La presenza di grandi linfociti reattivi tipo Downey caratterizza l'aumento del Mean Vol LI=100 e del grado di dispersione volumetrica (SD Vol LI=24).

Discussione e Conclusioni: Utili ulteriori trials clinici per definire univocamente i valori di normalità e i valori specifici per gruppi omogenei di patologie. Possibilità di costruire semplici modelli matematici gestiti da un software per generare un orientamento prediagnostico contestualmente all'esame emocromo.

VERIFICA CITOFUORIMETRICA DEI VALORI DI RIFERIMENTO DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE

A-10

Ghimenti M.*, Bocchicchio R.*, Panicucci E.*, Carulli G., Berni R.*, Pietrini P.***

*U.O. Laboratorio Analisi Specialistiche Clinica Madica 2a **U.O. Ematologia

Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana - Pisa

Scopo del lavoro. La citofluorimetria negli ultimi anni ha esteso enormemente la sua applicazione, sia per quanto concerne la diversità dei materiali analizzati, sia per le componenti monoclonali sempre più numerose. Da quattordici anni a questa parte, cioè da quando l'Azienda Ospedaliera Pisana ha realizzato il "Progetto AIDS", nel nostro laboratorio abbiamo visto una richiesta di tipizzazione linfocitaria sempre più numerosa e per scopi sempre più differenti e specifici, tanto che ci siamo posti il problema di verificare la bontà dei dati dei valori normali che avevamo estrapolato allora.

Materiali e metodi. Il procedimento adottato e lo strumento utilizzato sono gli stessi utilizzati nella precedente determinazione. Abbiamo eseguito la determinazione dei CD su 100 donatori maschi e femmine in condizioni cliniche normali. Il sangue, raccolto in EDTA K3, è stato analizzato al citofluorimetro Becton Dickinsons Fasca applicando la seguente metodica: in 3 provette, contenenti 100 ml di sangue ciascuna, aggiungere rispettivamente 20ml di Simultest leucoGATE, 20ml di controllo Simultest, 20ml di AbMo. Incubare 20' al buio a T.A. Aggiungere a ciascuna provetta 2 ml di lisante. Attendere 15' al buio a T.A.

Per ciascun campione sono stati acquisiti almeno 10.000 eventi. Il gate linfocitario è stato controllato con la coppia CD45/CD14 per saggiare la purezza del gate verificando che la percentuale di linfociti fosse pari o maggiore al 95% e che includesse più del 90% dei linfociti totali.

Risultati. Alcuni valori di CD sono cambiati, mentre altri sono sostanzialmente gli stessi. Il cambiamento riguarda soprattutto la popolazione dei linfociti T. Abbiamo avuto riscontro in merito confrontando i nuovi valori ottenuti con pubblicazioni di altri laboratori. Inoltre abbiamo messo a confronto i valori ottenuti dei donatori maschi e femmine non riscontrando variazioni di sorta riguardo al sesso.

Discussione e conclusioni. Con questo studio abbiamo potuto osservare come questi parametri possano subire un cambiamento nel tempo e come sia necessario seguire queste evoluzioni. Anche se oggi non abbiamo la possibilità di dimostrarlo, è probabile che alcune variazioni dei valori normali dell'immunofenotipo linfocitario nel tempo siano legate a variazioni della "normale" stimolazione immunitaria (virus, sostanze presenti nell'ambiente, etc.). Vista la dinamicità dei cambiamenti, sarebbe auspicabile una maggiore comunicazione tra laboratori per un continuo monitoraggio degli stessi.

SENSIBILITÀ ANALITICA DEGLI STRUMENTI EMATOLOGICI DI ULTIMA GENERAZIONE NEL RILIEVO DI CELLULE IMMATURE IN CAMPIONI DI SOGGETTI AFFETTI DA PATOLOGIA ONCOEMATOLOGICA

A-11

Colatutto A.°, De Stasio G.*, Isola L.°, Marcon B.°, Sala P.°

°S.O.C. Analisi Cliniche Azienda Ospedaliera Santa Maria della Misericordia - Udine,

* Patologia Clinica e Sperimentale Università degli Studi di Udine.

Scopo del lavoro: Scopo di questo studio è di valutare in modo comparativo la differente sensibilità analitica tra due diversi strumenti ematologici automatizzati e la tecnica manuale.

Materiali e metodi: Sono stati processati 250 campioni di sangue di pazienti affetti da patologia oncoematologica accertata. I campioni pervenuti in laboratorio in provette vacutainer contenenti K3EDTA sono stati analizzati entro 2 ore con due strumenti ematologici automatizzati (Sysmex XE-2100 e Sysmex SE-9500) e con la tecnica manuale. Per ogni paziente sono stati effettuati due strisci di sangue periferico sui quali è stata eseguita una conta differenziale al microscopio ottico su 200 cellule ed in seguito, per ogni campione è stata calcolata la media dei valori risultati dalla lettura dei due vetrini.

Risultati: Sensibilità e specificità di XE-2100 nella ricerca dei granulociti immaturi rispettivamente: 95% e 90%.

Sensibilità e specificità di SE-9500 nella ricerca dei granulociti immaturi: 78% e 97%.

Sensibilità e specificità di XE-2100 nella ricerca dei blasti: 77% e 92%.

Sensibilità e specificità di SE-9500 nella ricerca dei blasti: 52% e 100%.

Sensibilità e specificità di XE-2100 nella ricerca degli eritroblasti: 93% e 89%.

Sensibilità e specificità di SE-9500 nella ricerca degli eritroblasti: 29% e 98%.

Discussione: Si nota che l'imprecisione analitica aumenta nei soggetti con valori di linfociti estremamente bassi o estremamente elevati. Il problema non sussiste per i pazienti leucopenici e leucocitosici in quanto, in ogni caso sono richieste precauzioni di indagine e l'osservazione dello striscio al microscopio. Per la ricerca delle cellule immature (blasti, granulociti immaturi ed eritroblasti), la tecnica manuale si pone in una posizione intermedia tra i due strumenti. È possibile affermare che la tecnica più sensibile è rappresentata dall'analizzatore automatico Sysmex XE-2100. Di particolare interesse è stata l'estrema sensibilità di questo strumento nella conta degli eritroblasti, grazie ad un canale dedicato alla conta diretta di queste cellule.

Conclusioni: Gli strumenti ematologici di ultima generazione hanno un'elevata sensibilità che permette all'esaminatore di rilevare minime alterazioni ematologiche che, indipendentemente dal fatto che siano significative clinicamente, consentono un primo screening automatizzato e saranno la base sulla quale l'ematologo potrà decidere quali campioni andranno approfonditi con la valutazione microscopica.

SENSIBILITÀ ANALITICA DEGLI STRUMENTI EMATOLOGICI DI ULTIMA GENERAZIONE NEL RILIEVO DI CELLULE IMMATURE IN CAMPIONI DI PAZIENTI IN GRAVIDANZA

A-12

Colatutto A.°, Marcon B.°, De Stasio G.*, Daminato A., Isola L.°, Sala P.°

°SOC Analisi Cliniche Azienda Ospedaliera Santa Maria della Misericordia – Udine

* Patologia Clinica e Sperimentale Università degli Studi di Udine.

Scopo: E' frequente imbattersi in campioni di pazienti gravide che vengono segnalati come patologici dalla strumentazione. L'analizzatore ematologico Sysmex XE-2100 grazie ad un'analisi paragonabile a quella del citofluorimetro è in grado di segnalare anche la presenza, peraltro nota in pazienti gravide, di elementi immaturi della serie granulocitaria. Lo scopo del presente studio è quello di verificare se si possa omettere la valutazione microscopica nei campioni che, non presentando altre più complesse anomalie o segni di scompenso mieloide, presentano l'allarme "Granulociti Immaturi".

Materiali e metodi: Sono stati presi in considerazione 250 campioni di sangue periferico di pazienti gravide, in provette "vacutainer" contenenti K₃EDTA ed analizzati prima con il Sysmex XE-2100 ed in seguito con la tecnica manuale dello striscio di sangue periferico valutato al microscopio ottico (la conta veniva eseguita su 200 elementi cellulari da due diversi esaminatori).

Risultati: Sensibilità strumentale vs m.o. in doppio nella ricerca dei mielociti: 95%

Specificità strumentale vs m.o. in doppio nella ricerca di mieloblasti 94%

Specificità strumentale vs m.o. in doppio nella ricerca di eritroblasti 95%

Discussione: Eventuali alterazioni ematologiche in gravidanza sono dovute a normali variazioni fisiologiche che avvengono costantemente e regolarmente e devono essere distinte dalla presenza di rari eventi patologici. Nelle gravide è frequente notare lo spostamento a sinistra della formula di Harneth, si possono trovare nello striscio metamielociti e mielociti. Questo aspetto unito alla consueta neutrofilia può determinare dei quadri che sono sconcertanti tenendo anche conto del fatto che le piastrine possono diminuire fino al 20% in ragione dell'emodiluizione. Questo quadro associato all'anemia potrebbe indurre il sospetto di una patologia ematologica e quindi l'allarme strumentale deve essere ben conosciuto dal patologo per poter screenare i campioni patologici.

Conclusioni: Nel caso di pazienti gravide si può tranquillamente affermare che l'allarme strumentale che segnala un aumento della popolazione dei granulociti immaturi non è indicativo di patologia oncoematologica. Nessuno dei 250 campioni analizzati al microscopio ottico ha evidenziato patologie ematologiche ma solo alterazioni fisiologiche ben note, pertanto la presenza di allarmi strumentali, in assenza di segni di scompenso mieloide, non deve indurre un sovraccarico di lavoro a causa di un eccesso di sensibilità strumentale.

PREVALENZA DELLE DIVERSE FORME DI ANEMIA NELLA POPOLAZIONE DELL'ALTO FRIULI**A-13****Carlassara S., Venchiarutti A., Bizzaro N.**

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Gemona (UD)

Scopo dello studio. Valutare la prevalenza delle varie forme di anemia nella popolazione adulta del territorio gemonese.

Metodi. In un periodo di 6 mesi, sono stati analizzati i dati relativi a 10.445 pazienti consecutivi ambulatoriali, di età compresa tra i 14 e gli 80 anni che presentavano valori di emoglobina (Hb) ≥ 11 g/L. L'esame emocromocitometrico è stato eseguito su sangue intero raccolto in provette Vacutainer con K2EDTA, e processato su analizzatore automatico Cell-Dyn 3700 (Abbott, Milano). La conta reticolocitaria è stata effettuata al microscopio ottico su preparati colorati con new blu di metilene. Il dosaggio di sideremia, transferrinemia e ferritinemia è stato eseguito su campioni di siero prelevati contestualmente, utilizzando l'analizzatore Aeroset (Abbott). I parametri ematochimici sono stati incrociati con i dati clinici forniti dai medici curanti.

Risultati. 327 pazienti (256 donne e 71 uomini) su 10.445 (3.1%) presentavano valori di Hb ≥ 11 g/L. Di questi, 148 (45.2%) sono risultati affetti da anemia ipocromica microcitica iposideremica con diminuiti valori di ferritinemia; i due terzi di questi pazienti erano costituiti da donne in età fertile senza evidenza di sanguinamento dal tratto gastroenterico o genitale; 52 (15.9%) da anemia normocitica normocromica da ridotta eritropoiesi (pazienti neoplastici o con malattie croniche, insufficienza renale); 24 (7.3%) da anemia microcitica normosideremica (tra cui 4 casi di β -talassemia eterozigote); 17 (5.2%) da anemia macrocitica da deficit di folati (per lo più da abuso alcolico); 45 (13.8%) da anemie di varia natura (ridotto assorbimento, celiachia, alterazioni della membrana eritrocitaria, da perdita ematica) o non (ancora) classificate; 41 (12.5%) pazienti sono stati persi al follow-up.

Conclusioni. Questo studio ci ha consentito di appurare che, come nel resto del territorio nazionale, la causa prevalente di anemia nella popolazione dell'Alto Friuli è costituita da carenza marziale e che le forme di trait β -talassemico sono rare in quest'area geografica. L'effettuazione di questo studio ha prodotto anche due conseguenze rilevanti sul piano formativo e professionale: da un lato una maggior attenzione da parte del personale tecnico ai dati forniti dagli analizzatori ematologici e un complessivo miglioramento della fase analitica; dall'altro, un'augmentata collaborazione clinico-diagnostica con i medici di medicina generale nella definizione dei casi di anemia.

COMPORAMENTO DI ALCUNI PARAMETRI EMATOLOGICI DURANTE UN'ESPLORAZIONE IPOGEA**A-14****Stenner E^o., Gianoli E*., Piccinini C*., Biasioli B*.**

^oScuola Specializzazione Biochimica Clinica, Università di Padova, *Dipartimento di Medicina di Laboratorio-Azienda Ospedaliera Universitaria, Trieste

Scopo del lavoro. Verificare eventuali modificazioni dei principali parametri ematologici in grotta.

Materiali e Metodi. La sperimentazione si è svolta in una grotta alpina (inizio: 2pm, fine: 8am giorno dopo). L'emocromo con formula (Coulter LH 750 ANALYZER) è stato eseguito, su 4 speleologi (3 esperti, 1 amatoriale), con il seguente protocollo: 1°-7.30am, 2°-sul fondo della grotta (-700m) a 5 h dall'ingresso; 3°-in uscita, dopo 18 ore; 4°- 7.30am del giorno dopo.

Risultati

Tab. 1: variazioni % medie di alcuni parametri ematologici rispetto alle condizioni basali (1° prelievo)

PRELIEVO	WBC	NEU	LINF	MON	EOS	BAS	RBC	Hgb	Hct
2°	+ 116	+ 225	- 7.2	+ 27.2	- 57.3	- 16.7	+ 3.9	+ 2.3	+ 2.9
3°	+ 127	+ 248	- 30.5	+ 106	- 82.7	+ 16.7	+ 1.3	+ 0.6	+ 0.1
4°	+ 6.9	+ 26	- 22	+ 7.6	+ 10.7	- 27.8	- 4.2	- 4.6	- 5.3

Non vi sono differenze significative per MCV, MCH, MCHC e RDW

Discussione e Conclusioni. Serie bianca-le variazioni osservate riteniamo, in accordo con la letteratura, siano dovute a più fattori: effetti delle catecolamine e del cortisolo, risposta infiammatoria indotta dal danno tissutale (esercizio fisico intenso, frequenti impatti sulla roccia), rigide temperature e privazione del sonno. Serie rossa-supponiamo che l'iniziale emocostrizione sia dovuta alla disidratazione (esercizio fisico e ambiente molto umido) mentre la successiva emodiluizione sia causata dalla vasocostrizione periferica (all'uscita: -15°C) e dalla risposta del sistema renina-aldosterone.

VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA ATTUALE DI ANEMIA SIDEROPENICA ED ALTRE PATOLOGIE ERITROCITARIE IN AMBITO PEDIATRICO

A-15

Talento B.^o, Di Palma A.^o, Avino D.^o, Amendola G.*, Rescigno G.^o, Marchitello R.^o, Danise P.^o

^oPatologia Clinica - Diagnostica Ematologica, *Onco-Ematologia Pediatrica, P.O. Umberto I Nocera Inferiore ASL SA 1

Scopo del Lavoro. Per valutare l'incidenza di anemia nella popolazione pediatrica nelle attuali condizioni socio-economiche, essendo scarsi i dati epidemiologici disponibili, è stata effettuata una campagna di screening sui bambini di età compresa fra 6 e 10 anni, delle scuole elementari dei 10 Comuni della Costa di Amalfi.

Contestualmente sono stati ricavati i valori di riferimento dalla popolazione "sana", anche per i parametri qualitativi eritrocitari e reticolocitari.

Materiali e metodi. Popolazione esaminata: 1069 bambini (564f, 505m) età 6-10 anni. Modalità di svolgimento: informazione e richiesta consenso ai genitori, visita preliminare, raccolta anamnesi, prelievo, consegna referti in loco. Esami effettuati: emocromo con dati qualitativi su eritrociti e reticolociti (ADVIA 120 Bayer). Ferritinemia (ABBOTT). Recettore solubile della Transferrina (DASIT). HPLC Emoglobina (BIORAD)

Risultati. Incidenza di anemia sideropenica:(hb<11,5g/dl, ferritinemia<15ng/ml) 0,6% (7 su 1069). Incidenza di sideropenia senza anemia:(hb>11,5g/dl, ferritinemia <15g/dl) 8,1% (86 su 1069). L'incidenza globale di sideropenia è risultata variabile da comune a comune (range 3,5 - 12). B talassemia eterozigote:2,1% (22 su 1069). Microcitosi non B talassemica: 0,3% (3 su 1069). Livello di Hb A2 < alla norma: 1,2% (12 su 1069). Sferocitosi ereditaria: 0,1% (1 su 1069)

Discussione e conclusioni. La popolazione esaminata è di tipologia socio-economica "media", con buona attenzione alle problematiche del bambino, evidenziata da adesione alla campagna > all'80%. L'incidenza di anemia sideropenica è risultata notevolmente inferiore alle stime del WHO(1985) per i paesi sviluppati (0,6% vs 13%). L'incidenza di sideropenia senza anemia è risultata non trascurabile (8,1%); a tale risultato ha contribuito la scelta di un valore "normale" abbastanza elevato nell'ambito dei dati presenti in letteratura.

I buoni risultati sono verosimilmente ascrivibili alle migliorate condizioni di vita materno-infantili più che ad una tendenza all'over-trattamento dei bambini spesso basata su un basso valore di sideremia, notoriamente aspecifico.

I dati relativi alle anemie di tipo talassemico sono in linea con quanto previsto, con livello di precedente informazione dei portatori abbastanza elevato (75%) pur in assenza di una politica organica di screening regionale. L'incidenza di bassi livelli di Hb A2 consente di ipotizzare una elevata presenza di delta talassemia, da confermare con studi di tipo molecolare. I valori di riferimento sono stati ottenuti anche per i numerosi indici eritrocitari e reticolocitari forniti dagli analizzatori Bayer Advia 120 (% emazie ipocromiche, CH ret., MCV ret. etc.).

LEUCEMIA A PLASMACELLOLE: IL CASO CLINICO DI UNA FORMA PRIMITIVA

A-16

Cione S., Gioia F., Giani A., De Francesco D., Montalbetti L.*

Laboratorio Analisi, P.O. Busto Arsizio, A.O. Ospedale di Circolo di Busto Arsizio, Medicina 3*, P.O. Busto Arsizio, A.O. Ospedale di Circolo di Busto Arsizio

Scopo del lavoro: Segnalazione di un caso clinico: Leucemia a plasmacellule(LPl)a primitiva. La diagnosi di LPl a si pone solo quando le plasmacellule sono presenti nel sangue periferico in numero assoluto non inferiore a 20.000/microL o percentualmente pari o maggiori del 20% degli elementi nucleati. Di norma è la complicazione terminale di un Mieloma Multiplo; estremamente rara è la forma primitiva che si presenta come una leucemia acuta rapidamente ingravescente a prognosi infausta: la sopravvivenza media è inferiore a 10 mesi dalla diagnosi. Caso Clinico: Il sig. R.G., 76 anni, giunge al nostro PS con astenia e dolori persistenti ed invalidanti da fratture patologiche costali. L'esame emocromocitometrico evidenzia leucocitosi, anemia e moderata piastrinopenia. Si ricovera nella U.O. di Medicina 3.

Materiali e metodi: L'emocromo(Advia120,Bayer),ha evidenziato WBC 31.650/microL con granulociti neutrofili pari al 16.8%(5.300/microL) e LUC(Large Unstained Cells)54.7%(17.300/microL), HGB 9.5 g/dL e PLT 102.000/microL. L'aspetto dei citogrammi era quello di una leucemia acuta perossidasi negativa(linfoide o mieloide immatura),e l'altezza del fuso di LUC indicava la presenza di cellule di grandi dimensioni. L'esame morfologico del sangue periferico ha dimostrato la presenza del 5% di blasti e del 45% di plasmacellule, in parte atipiche ed immature. Nel siero si è dosato: Ca 10.2 mg/dL, ALP 540 UI/L, LDH 555 UI/L, PT 8.8 g/dL. L'elettroforesi(Capillarys,Sebia) ha evidenziato una CM di 2.48 g/dL, tipizzata come IgGL(Hydrasys,Sebia). La proteinuria di Bence Jones era costituita da catene leggere Lambda con proteinuria di 3.8 g/24 ore.

*Risultati:*L'aspirato midollare ha evidenziato una popolazione cellulare costituita per l'80% da plasmacellule con morfologia prevalentemente immatura e con aspetti atipici. Lo studio del fenotipo immunologico (Epics XL MCL,IL),su sangue midollare, ha evidenziato un cluster cellulare, pari al 70% ca. delle cellule in sospensione, con immunofenotipo CD38+, CD138+, restrizione clonale per catene leggere lambda, CD19- e CD56-. L'analisi del cariotipo, eseguito presso altra struttura, non ha dato esito dirimente. Dall'analisi complessiva dei dati si è dimostrata la natura neoplastica delle plasmacellule.

Discussione e conclusioni: Il paziente, nei pregressi ricoveri per BPCO e IMA(2 anni fa), non presentava segni, clinici o bioumorali, riferibili a MM, pertanto si è ritenuto plausibile porre diagnosi di Leucemia a plasmacellule di natura primitiva, il cui esordio è tipicamente sovrapponibile ad una leucosi acuta; di contro, le lesioni osteolitiche sono rare, tuttavia, il nostro caso ha dimostrato che non è possibile escludere un esordio con tale sintomatologia.

UTILITÀ DELL'ALLARME DI SOSPETTO "LINFOBLASTI" SU COULTER LH750 NELLA DIAGNOSI E FOLLOW-UP DI LEUCEMIA LINFATICA ACUTA INFANTILE

A-17

Anzil G., Lorenzon A., Ruscio M.

Dipartimento Diagnostico e Strumentale ASS 4 "Medio Friuli"
Laboratorio Analisi Cliniche e Microbiologia - Ospedale di San Daniele del Friuli

Scopo del lavoro: Descrizione di un caso di LLA infantile con allarme "Linfoblasti" su Coulter LH750.

Materiali e metodi: Coulter LH750 esegue conteggi WBC/RBC/Plt con tecnologia AccuCount e Formula+NRBC e RET con tecnologia VCS - Volume, Conduttività (grandezza/densità nucleo; rapporto nucleo/citoplasma), Scatter laser (granulazioni citoplasmatiche) su cellule allo stato nativo o, per i RET, dopo colorazione con nuovo blu di metilene; la formula è completata da 24 dati di ricerca, i Parametri Posizionali (PP), che indicano Media (M) e Deviazione Standard (SD) dei parametri VCS, la cui variazione, caratterizza specifiche patologie (Piccinini, ISLH2004); Microscopio Ottico; striscio periferico colorato con MGG.

Risultati: Caso di una bambina di 3 anni con febbre e tumefazione sottomandibolare destra. Vengono eseguiti alcuni accertamenti tra cui emocromo con formula e anticorpi anti EBV, che risulta negativo, allontanando in tal modo il sospetto di mononucleosi. I dati dell'emocromo sono (unità US): WBC=13.4, RBC=5.12, Hgb=11.2, Plt=81, LI%=62.8, LI#=8.4, accompagnati dagli allarmi "Linfoblasti" e "Linfocitosi assoluta" oltre che da evidenti anomalie di distribuzione delle popolazioni sul citogramma VCS. L'allarme "Linfoblasti" viene supportato dall'aumento significativo dei PP dei linfociti con LI SD(V)=23.93 e LI SD(C)=15.31 (v.n. 13.7±1 e 10.5±1.6 rispettivamente). L'esame morfologico del periferico conferma la presenza di linfoblasti e di elementi immaturi linfoidi che suggeriscono la necessità di ulteriori indagini. L'analisi immunofenotipica rivela la presenza di cellule immature CD3+/CD7+/CD99+ e conferma la diagnosi di Leucemia Linfatica Acuta a cellule T. Dopo un primo ciclo di chemioterapia viene eseguito un emocromo di controllo (+21gg) con i seguenti risultati: WBC=1.5, RBC=3.5, Hgb=9.0, Plt=471, LI%=71.3, LI#=1.1 e nessun allarme di sospetto. I suddetti PP risultano nella norma. Infine il periferico conferma i dati strumentali e l'assenza di cellule immature.

Discussione e conclusioni: L'allarme di sospetto "Linfoblasti" fornito dall'analizzatore Coulter LH750 ha permesso di orientare correttamente la diagnosi per LLA.

I valori anomali delle SD del volume e conduttività dei linfociti hanno ulteriormente avvalorato il significato clinico del messaggio "linfoblasti". L'attuale situazione organizzativa del laboratorio di ematologia prevede l'esecuzione giornaliera di un numero rilevante di campioni. Alla strumentazione, oltre all'accuratezza delle conte, si richiede di raggiungere la maggior sensibilità possibile sui campioni patologici, non a scapito della specificità.

MODIFICAZIONE DEGLI INDICI RETICOLOCITARI E DEL BILANCIO MARZIALE IN UN MODELLO COSTITUITO DA SOGGETTI SOTTOPOSTI A FLEBOTOMIA E SUPPLEMENTATI CON FERRO ED EPO

A-18

Gessoni G., Trabuo E., Valverde S., Antico F., Giacomini A.

Dipartimento di Patologia Clinica A-ULS 14 Chioggia

Scopo del lavoro: in soggetti sottoposti ad un regime di pre-deposito aggressivo è spesso opportuna una supplementazione con ferro ed eritropoietina EPO. In questo caso è importante che tale supplementazione sia ottimale al fine di evitare un'eritropoiesi deficiente di ferro.

Materiali e Metodi: sono stati studiati 37 pazienti, per i quali erano state richieste 5 unità di sangue autologo da prelevare in un mese. Tutti questi pazienti sono stati supplementati da EPO 10.000 unità sc e ferro gluconato 125 mg ev per 2 volte alla settimana. L'esame emocitometrico, gli indici reticolocitari e lo studio del metabolismo marziali sono stati studiati all'inizio e alla fine del protocollo di flebotomia.

Sono stati studiati i seguenti parametri: RBC, Hb, Hct, Mcv, Mch, Mchc, Wbc, PLT, sideremia, transferrina, ferritina, indice di saturazione della transferrina, recettore solubile della transferrina, conta reticolocitaria, Indice di maturazione reticolocitaria, Rmch, RMchc e il valore percentuale d'elementi ipocromici. Tutti questi parametri sono stati confrontati utilizzando Test di Student per dati appaiati. Per i parametri emocitometrici è stato usato lo strumento ADVIA 120 della Bayer mentre i parametri del metabolismo marziale sono stati analizzati nell'Aeroset della ditta Abbot.

Risultati: dai 37 pazienti sono state ottenute n.163 unità ematiche, con una media di 4.4 sacche per paziente.

Tra i parametri emocitometrici è stata osservata un'espressiva diminuzione di RBC, Hct ed Hb mentre per i parametri reticolocitari è stata osservata un aumento del numero di reticolociti, un incremento degli elementi più immaturi e delle componenti ipocromiche. Tra i parametri del metabolismo marziale l'unica modificazione osservata riguardava il recettore solubile della transferrina che era significativamente aumentato.

Discussione e Conclusioni: i dati ottenuti dal nostro studio dimostrano che in questi pazienti, nonostante un'apparentemente adeguata supplementazione marziale e il sommersi di due stimoli all'eritropoiesi (somministrazione di ferro gluconato e eritropoietina), le ripetute flebotomie comportano uno stimolo dell'eritrono talmente intenso da comportare sempre l'instaurarsi di un'eritropoiesi inefficiente da sideropenia relativa.

Il recettore solubile della transferrina è stato l'unico parametro del metabolismo marziale, in grado di evidenziare l'eritropoiesi ferrocarente da flebotomia terapeutica.

UTILITA' DEI PARAMETRI ERITROCITARI E RETICOLOCITARI NELLA DIAGNOSI DI DEFICIT DI FERRO

A-19

Doretto P., Bulian P., Cappelletti P.

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, S.C. di Patologia Clinica, AOSMA Pordenone.

Scopo del lavoro. Valutare la correlazione tra i parametri reticolocitari ed eritrocitari ed il ferro midollare colorabile e calcolarne l'efficienza diagnostica ed il cut-off ottimale predire l'assenza di ferro colorabile nel midollo usando il test di Perls come gold standard.

Materiali e Metodi. Sono stati studiati 323 pazienti sottoposti ad aspirato midollare (201 ambulatoriali e 112 ricoverati), 154 femmine e 169 maschi, di età compresa tra 11 e 89 anni con le seguenti patologie: s. linfoproliferative croniche (34%), alterazioni ematologiche benigne (34,3%), leucemie acute, SMC e SMD (23,5%), negativi/non diagnostici (7%), metastasi (1%). I parametri reticolocitari ed emocromocitometrici sono stati ottenuti con ADVIA 120 Bayer. Gli aspirati midollari sono stati raccolti in K3EDTA e colorati per il ferro con il blu di Prussia (test di Perls). In base al contenuto in ferro i campioni midollari sono stati classificati in 6 gruppi secondo una scala semiquantitativa: da 0 (ferro assente) a 5+ (ferro molto abbondante). Identificati con la correlazione per ranghi di Spearman i parametri che correlano con il ferro midollare, confrontando il gruppo 0 con tutti gli altri insieme, ne abbiamo valutato l'efficienza clinica mediante le curve ROC.

Risultati. Diversi parametri presentano una correlazione significativa (positiva o negativa) con il ferro colorabile midollare, anche se non elevata per l'eterogeneità della popolazione in esame. I parametri con maggiore efficienza diagnostica globale sono CHR (Area: $0,777 \pm 0,046$, cut-off: 29,8, sensibilità: 65,4, specificità 79,7, VPP: 22,1, VPN: 96,3), CH (Area: $0,777 \pm 0,056$, cut-off: 28,7, sensibilità: 69,2, specificità 76,3, VPP: 20,5, VPN: 96,6), MCV (Area: $0,757 \pm 0,049$, cut-off: 87,6, sensibilità: 73,1, specificità 70,8, VPP: 18,1, VPN: 96,8).

Discussione e Conclusioni. Visto l'elevato VPN, i parametri eritrocitari e reticolocitari sembrano in grado di predire la presenza piuttosto che l'assenza di ferro midollare, ma con una specificità non ottimale vista la prevalenza dei pazienti con ferro presente. Il parametro con la migliore efficienza diagnostica è risultato CHR; il basso VPP è legato alla bassa prevalenza dei pazienti con depositi di ferro assenti (8%) e alla presenza numerosi pazienti con deficit funzionale di ferro (con midollo reattivo o con patologie a tipo anemia da malattia cronica), non correlato ai depositi midollari. CHR e ferro colorabile midollare colgono aspetti diversi e complementari del metabolismo del ferro: il primo valuta l'utilizzo del ferro nella sede di sintesi dell'emoglobina, espressione diretta del bilancio ferro-eritropoiesi, l'altro è una misura statica dei depositi di ferro midollare.

I PARAMETRI POSIZIONALI DEL SISTEMA EMATOLOGICO TOA-SYSMEX XE-2100 NELLE SINDROMI MIELODISPLASTICHE

A-20

Campoli D., Ottomano A.M., Simoni L., Bergonzini G., Chiodino C., Canovi L., Carbonieri A.

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche. Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico di Modena

Scopo del lavoro: Il sistema ematologico Toa-Sysmex XE-2100 fornisce un esame emocromocitometrico con conteggio leucocitario differenziale eseguito mediante tecnologia ottica e utilizzo di un colorante fluorescente. In una pagina di servizio del canale DIFF sono forniti alcuni parametri di ricerca tra i cui: NEUT-X, NEUT-Y, LYMPH-X e LYMPH-Y che si possono definire come le coordinate di distribuzione delle popolazioni dei Neutrofili e dei Linfociti nel citogramma. Scopo del nostro lavoro era di valutare la possibilità che questi parametri forniscano informazioni complementari su aspetti qualitativi delle popolazioni cellulari esaminate. Dopo averne definito i limiti di riferimento nella popolazione normale, abbiamo esaminato il comportamento di tali parametri nelle sindromi mielodisplastiche.

Materiali e metodi: abbiamo eseguito l'esame emocromocitometrico su sistema Toa Sysmex XE-2100 in modalità CBC + DIFF su 30 campioni di sangue periferico raccolto in EDTA(K3) selezionati per la presenza di alterazioni morfologiche di tipo displastico a carico dei granulociti neutrofili rilevate durante l'osservazione al microscopio ottico.

Risultati: In tutti i casi studiati si riscontrava lo scostamento di uno o di entrambi i parametri posizionali relativi alla popolazione dei granulociti neutrofili (NEUT-X, NEUT-Y) rispetto agli intervalli di riferimento, con variazioni che potevano essere di segno positivo o negativo e variamente combinati tra di loro con una suggestiva corrispondenza con la variabilità delle alterazioni morfologiche possibili: anomalie della segmentazione nucleare (iposegmentati o ipersegmentati), della densità cromatinica (diminuita o aumentata) delle granulazioni citoplasmatiche (ipogranularità o ipergranularità).

Discussione: I risultati ottenuti confermano l'utilità dei parametri posizionali nel descrivere i caratteri morfologici della popolazione dei granulociti neutrofili nelle sindromi mielodisplastiche primitive o secondarie consentendo di individuare alcuni pattern sufficientemente caratterizzati: la ipogranularità correla con NEUT-X e/o NEUT-Y diminuiti; le anomalie tipo pelger (nucleo non segmentato, ma con cromatina matura) determinano NEUT-X e/o NEUT-Y diminuiti; ipersegmentazione nucleare e ipergranularità displastiche inducono aumento di NEUT-X e/o NEUT-Y. La presenza di granulociti iposegmentati senza alterazioni displastiche, come si riscontra in condizioni reattive, può determinare un aumento del NEUT-Y, ma non del NEUT-X.

UN CASO DI IPERLEUCOCITOSI**A-21****Piccinini C.***, **Festini G.****, **Visintini L.***, **Celentano E.***

*Dipartimento di Medicina di Laboratorio AOU - Trieste **S.C. II Medica Sezione Ematologia AOU Trieste

Scopo del lavoro: descrizione di un caso di interferenza, determinata da iperleucocitosi, sull'analizzatore Coulter LH 750

Materiali e Metodi: si tratta di una paziente di 59 anni affetta da BCLL inviata dal medico di medicina generale alla Sezione di Ematologia della S.C. II Medica per un peggioramento delle condizioni generali. A seguito del ricovero, viene eseguito l'esame emocromocitometrico sull'analizzatore ematologico Coulter LH 750.

Risultati: si evidenzia una leucocitosi (435.900/mmc) eccedente i limiti di linearità dello strumento nonostante questo sia molto elevato (400.000/mmc). Il numero dei leucociti ed anche tutti gli altri parametri dell'emocromo, tranne le piastrine, sono allarmati. Sono anche presenti flag relative a tutte le popolazioni leucocitarie. Le diluizioni del campione 1:2 ed 1:3 non sono sufficienti in quanto non eliminano gli allarmi e le flag e, in più, compare il conteggio di eritroblasti (9.1%). Alla diluizione 1:10, invece, scompaiono gli allarmi e gli eritroblasti non sono più rilevati; le flag si riducono alla segnalazione di leucocitosi e linfocitosi assolute e di presenza di linfociti varianti. La quantificazione finale dei leucociti è di 834.000/mmc. All'esame microscopico si evidenzia la presenza di 94% di linfociti, 4% di prolinfociti, non si repertano eritroblasti.

Discussione e conclusioni: la gran quantità di cellule ha determinato, anche nei campioni a diluizione non spinta, una serie di false flag ed interferenza nella zona del citogramma tridimensionale dove, di solito, si collocano gli eritroblasti. L'interferenza, probabilmente accentuata dalla presenza di residui cellulari derivanti da linfociti particolarmente fragili, è evidenziabile sia all'osservazione del citogramma che della curva di distribuzione dei volumi leucocitari e deve indurre ad azioni correttive. Da sottolineare che la quantificazione dell'Hb e delle piastrine è stata solo modestamente sovrastimata.

INFILTRAZIONE MIDOLLARE NEI LINFOMI NON-HODGKIN. UTILITA' DI UN APPROCCIO DIAGNOSTICO MULTIPARAMETRICO**A-22****Ghimenti M.***, **Carulli G.****, **Galimberti S.****, **Bocchicchio R.***, **Pacini S.****, **Zucca A.****, **Pietrini P.***, **Petrini M****

*Laboratorio di Analisi Cliniche Specializzate, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana;

**Divisione di Ematologia, Dipartimento di Oncologia, dei Trapianti e delle Nuove Tecnologie in Medicina, Università di Pisa

Scopo del lavoro: La valutazione dell'infiltrazione midollare nei linfomi non-Hodgkin (LNH) costituisce una fase importante della stadiazione dei pazienti e condiziona spesso la scelta terapeutica. La biopsia osteomidollare (BOM) è ancora considerata il gold standard, ma citofluorimetria (CFM) e tecniche di biologia molecolare sono eseguite sempre più spesso. Il loro ruolo non è ancora stato completamente definito. In questo lavoro è stato eseguito il confronto tra CFM e BOM in una serie di pazienti affetti da LNH a B-cellule ed è stata valutata l'utilità dell'impiego aggiuntivo di tecniche di biologia molecolare mediante PCR nei casi di mancato accordo diagnostico.

Materiali e metodi: Sono stati valutati 114 pazienti con LNH a B-cellule (51 alla diagnosi, 63 durante il follow-up post-terapia), sottoposti all'esecuzione contemporanea di BOM e mieloaspirato. La BOM è stata valutata dopo esecuzione di colorazioni standard ed immunoistochimica. La CFM è stata eseguita con metodo a tre colori ed identificazione dei B-linfociti mediante CD45: parametri indicativi di infiltrazione mediante CFM sono stati considerati un alterato rapporto k/λ di superficie e/o un pattern immunofenotipico specifico di particolari LNH (leucemia linfatica cronica, linfoma mantellare, Hairy Cell Leukemia). Quando necessario sono stati eseguiti test di PCR riguardanti il riarrangiamento del gene codificante per le catene pesanti delle immunoglobuline (IgH) e la traslocazione BCL-JH (indicativa di linfoma mantellare).

Risultati: CFM e BOM hanno mostrato concordanza nell'89.5% dei casi (48 casi positivi e 54 casi negativi con entrambe le metodiche). Nei casi discordanti (7.9%; 5 con CFM- e BOM+, 4 con CFM+ e BOM-) il riarrangiamento IgH e l'espressione del gene di fusione BCL-1/JH hanno permesso di identificare come positivi 6 casi altrimenti dubbi. Nei casi non valutabili mediante CFM (2.6%) e negativi mediante BOM, le tecniche di PCR hanno confermato l'assenza di infiltrazione.

Discussione e conclusioni: L'infiltrazione midollare è un aspetto biologico dei LNH che deve essere valutato mediante combinazione di più metodi. I nostri risultati mostrano un ruolo complementare delle tre metodiche impiegate, suggerendo la necessità di un'analisi più complessa e dell'applicazione sistematica delle tecniche di PCR soprattutto nei casi con infiltrazione minima.

POSSIBLE ROLE OF P-SELECTIN AS A MARKER OF INFLAMMATION AND ENDOTHELIAL DAMAGE IN CORONARIC BRACHITHERAPY (IRTC)

A-23

Ruocco L., De Carlo M.°, Vanacore R.*, Pavia T., Manganiello M., Pellegrini G., Petronio A.S.°

U.O. Laboratorio Analisi Cliniche, ° U.O. Cardiologia Universitaria, * U.O. Immunoematologia, Azienda Ospedaliera Universitaria, Pisa

Aim of the study: Intracoronary radiation therapy (ICRT) is the most effective treatment for in-stent restenosis (ISR), but is associated with delayed re-endothelization. Our aim was to evaluate the inflammatory reaction to ICRT (with ^{32}P -emitting source) by measuring the transcardiac gradient of different markers of inflammation and endothelial dysfunction.

P-selectin is a transmembrane protein expressed on the surface of both activated platelets and endothelial cells. We evaluated the levels of soluble P-selectin, of platelet surface P-selectin (CD61/62), of the neutrophilic integrin CD11b, and of the monocyte-platelet complex CD45/61 in both aorta and coronary sinus (CS).

Material and Methods: In 11 patients undergoing ICRT (mean age 63 ± 11 years) arterial and CS blood samples were collected immediately before and after ICRT, at 1 hour, and at 24 hours. sP-sel (ELISA - R&D Systems), CD61/62, CD 11b, and CD45/61 (fluorescence-activated cell sorting analysis - FACSCALIBUR, BD) were assessed.

Results: ICRT was successful in all patients. sP-sel does not increase significantly through time. However, the peak % increase is correlated to the coronary treated length ($P=0.02$). sP-sel is correlated to CD45/61 ($P<0.001$) and CD61-62 ($P=0.001$).

CD61/62 does not increase through time, with no significant transcardiac gradient.

CD45/61 and CD11b increase through time ($P=0.07$ and $P=0.06$, respectively), with highest transcardiac gradient at 1 hour ($P=0.14$ and $P=0.16$). The peak % increase is significantly higher in diffuse ISR (both $P=0.01$) and for CD11b is correlated to the coronary treated length ($P=0.06$).

Discussion: The irradiation of the coronary segment after dilatation of the stenosis with a balloon, induces immediate inflammatory activation, which was more evident for CD45/61 and CD11b. The small number of patients and the high interindividual variability in sP-sel make the absolute changes in transcardiac gradient non significant. However, the peak % increase in sP-sel was related to the irradiated length. Interestingly, sP-sel was highly correlated with CD61/62 and CD45/61, representing an easier way to assess endothelial activation during coronary invasive procedures, compared with fluorescence-activated cell sorting analysis.

Bibliography: Waksman R, et al Intracoronary gamma radiation therapy after angioplasty inhibits recurrence in patients with in-stent restenosis. *Circulation* 200; 101:2165-71

Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* 2003;101: 2661-66

Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis.

ANALISI DELL'INTERFERENZA DA EMOLISI MARCATA SUI TEST DI FUNZIONALITÀ EMOCOAGULATIVA CON STRUMENTAZIONE STA-R: ACCETTABILITÀ DELL'INTERFERENZA

A-24

Fornier L., Rossetini G., Urbani D., Bedin A., Giavarina D.

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

Scopo del Lavoro. La presenza di emolisi nei campioni per test emocoagulativi è considerata critica, per le possibili interferenze nella lettura e per essere spia di una eventuale attivazione dei meccanismi di coagulazione in vitro. Il problema risulta ancor più rilevante se sistemi preanalitici di centrifugazione riducono le possibilità di controllo dei campioni. I metodi di rilevazione della formazione del coagulo attraverso sistemi elettromeccanici sono proposti come privi di interferenza da emolisi. Scopo di questo lavoro è verificare il bias prodotto dall'emolisi sui test di screening emocoagulativo con strumentazione Sta-R.

Materiali e Metodi. Studio caso controllo. Arruolati campioni di sangue in sodio-citrato 3,2% che presentavano una emolisi moderata-forte (da 2 a 5 g/dL di emoglobina) o marcata (oltre 5 g/dL). Sono stati eseguiti i test coagulativi: PT-INR, PTT, Fibrinogeno Clauss; cromogenici: Antitrombina III; immunoturbidimetrici: D-Dimero (Diagnostica Stago, Asnieres s/Seine, France). Per ogni campione emolizzato è stato richiesto un nuovo campione di sangue. Dopo verifica di emolisi inferiore a 0,2 g/dL sono stati eseguiti gli stessi test. La differenza è stata valutata secondo Bland e Altman.

Risultati Sono stati arruolati 18 campioni, 11 con emolisi marcata 7 con emolisi moderata - forte. La tabella riporta i bias emolizzato - non emolizzato (con intervallo di confidenza al 95%) e i limiti di variazione. Le differenze dei risultati tra campioni con emolisi marcata ed emolisi moderata sono risultate non significative per tutti i test.

Tabella. bias tra campioni emolizzati e non

	bias	95% C.I.	limiti di variazione	
PT-INR ¹	-0,067 (-6,7%)	(da -0,086 a -0,049)	-0,142	0,007
PTT ¹ (sec.)	-1,7 (-4,2%)	(da -3,4 a 0,1)	-8,7	5,4
FIB ¹ (mg/dL)	24,5 (6,8%)	(da 11,4 a 37,6)	-28,8	77,8
AT-III ¹ (%)	5,0 (5,7%)	(da 1,0 a 9,0)	-11,3	21,3
D-Dimer ¹ (μU/mL FEU)	-0,08 (6,7%)	(da -0,25 a 0,09)	-0,76	0,60

¹PT-INR: (tromboplastina calcica da cervello di coniglio); PTT (sec.): (aPTT con silice); FIB (mg/dL): (Clauss, con polibrene); AT-III (%) (cromogenica); D-Dimer (μU/mL FEU) : (Liatest D-Dimero)

Conclusioni. I bias risultano ininfluenti per INR, PTT e D-Dimero, trascurabili per l'AT-III. Un moderato bias positivo si evidenzia per il fibrinogeno, inferiore alla variabilità biologica del costituente (10.7%). I dati preliminari di questo lavoro sembrano indicare la accettabilità di campioni anche fortemente emolizzati per i test di valutazione emocoagulativa.

CINETICA DEL D-DIMERO IN INTERVENTI DI CHIRURGIA ORTOPEDICA**A-25****Lippi G.¹, Montagnana M.¹, Regis D.², Viola G.², Guidi G.C.¹**¹ Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Università di Verona; ² Unità Operativa di Ortopedia e Traumatologia, Azienda Ospedaliera di Verona

Scopo del lavoro. Tromboembolismo venoso (TEV) complica spesso interventi chirurgici. L'identificazione è essenziale per stratificare il rischio e per la gestione clinica.

Materiali e Metodi. La cinetica del D-dimero (DD), principale marcatore di TEV, è valutata in 37 pazienti sottoposti a chirurgia ortopedica maggiore (prima, 4h e 72h dopo l'intervento).

Risultati. I risultati sono presentati in tabella (media±DS). Considerando tutti i pazienti, DD aumenta a 4h e permane elevato a 72h. La percentuale di pazienti con valori superiori alla soglia diagnostica (>500 ng/ml) è maggiore a 4h (97 vs 65%; p<0.001) e 72h (100 vs 65%; p<0.001). Stratificando i pazienti per procedura, la concentrazione permane elevata, così come la percentuale di pazienti con valori superiori al cut-off (protesi anca: 100 vs 90% 4h e 72h, p<0.001; protesi ginocchio: 100 vs 77% 4h e 72h, p<0.001; stabilizzazione colonna: 93 vs 36% 4h, 100 vs 36% 72h, p<0.001).

Discussione e conclusioni. Per il trauma chirurgico, DD aumenta considerevolmente. La percentuale di pazienti con valori >cut-off è prossima al 100%, con efficacia diagnostica limitata. L'alta variabilità interindividuale (CV=60%), non consente soglie diagnostiche predittive.

Cinetica del d-dimero a seguito di d'interventi di chirurgia ortopedica maggiore

D-dimero (ng/ml)	Pre-intervento	4h post-intervento	72h post-intervento
Tutti i pazienti	781±616	3943±2736‡	2012±1166‡
Protesi d'anca	1114±711	5235±1965‡	2324±1709‡
Protesi di ginocchio	483±483	2332±1873‡	1628±738‡
Stabilizzazione di colonna	847±506	4685±3151‡	2185±878‡

‡ p < 0.01 rispetto al prelievo di base

VALUTAZIONE DI UN ASPETTO DELLA FASE PREANALITICA NELLA DETERMINAZIONE DEL TEMPO DI TROMBOPLASTINA PARZIALE ATTIVATA**A-26****Cosio G., Daves M., Scala S., Peer E., Raffagnini A., Floreani M., Rizza F.**

Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano

Scopo del lavoro: abbiamo valutato i risultati della determinazione del tempo di tromboplastina parziale attivata espressi come ratio ottenuti da campioni di donatori utilizzando differenti provette per coagulazione fornite da tre diverse ditte.

Materiali e metodi: abbiamo raccolto per 3 giorni consecutivi da 23 volontari (n=69 diversi donatori) 2 campioni di sangue per ciascun soggetto dispensati in differenti provette per coagulazione; 1° giorno: Terumo/Becton Dickinson (BD), 2° giorno Terumo/Greiner, 3° giorno Terumo/Kima. I prelievi sono stati eseguiti da un operatore esperto con ago da 21-gauge. Tutte le determinazioni sono state processate con l'analizzatore BCT (Dade-Behring).

Risultati: 1) provette in uso vs BD, Terumo: valore minimo 0.8, valore massimo 1.33, media 1.05, DS 0.11; BD: valore minimo 0.73, valore massimo 1.14, media 0.95, DS 0.08. Il coefficiente di correlazione r = 0.752, il Bland-Altman plot mostra una differenza percentuale della media del 15.7%, la regressione di Passing-Bablok risulta Y=-0.0394+0.0823X, slope 0.823 (95% CI da 0.500 a 1.286), intercetta 0.039 (95% CI da -0.453 a 0.385).

2) provette in uso vs Kima: Terumo: valore minimo 0.95, valore massimo 1.54, media 1.13, DS 0.13; Kima: valore minimo 0.89, valore massimo 1.18, media 1.01, DS 0.08. Il coefficiente di correlazione r = 0.924, il Bland-Altman plot mostra una differenza percentuale della media del 10.3%, la regressione di Passing-Bablok Y=0.212+0.712X, slope 0.712 (95% CI da 0.571 a 1.000), intercetta 0.2112 (95% CI da -0.100 a 0.369).

3) provette in uso vs Greiner: Terumo: valore minimo 0.91, valore massimo 1.33, media 1.10, DS 0.10; Greiner: valore minimo 0.78, valore massimo 1.22, media 0.99, DS 0.09. Il coefficiente di correlazione r = 0.527, il Bland-Altman plot mostra una differenza percentuale della media del 10.8%, la regressione di Passing-Bablok Y=0.267+0.667X, slope 0.667 (95% CI da 0.263 a 1.091), intercetta 0.267 (95% CI da -0.200 a 0.695).

Discussione e conclusioni: l'analisi statistica dei dati ottenuti indica che l'utilizzo di differenti provette con reagenti dello stesso lotto può portare a differenze significative nella valutazione del aPTT.

LA GENERAZIONE DI TROMBINA IN PAZIENTI CON EMOFILIA A

A-27

Salvagno G.L. 1, Berntorp E. 2, Astermark J. 2, Lippi G. 1, Poli G. 1, Guidi G.C. 1

1. Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Università di Verona; 2. Department of Coagulation Disorders, Malmö University, Sweden

Scopo del lavoro. Lo sviluppo d'anticorpi anti-FVIII è una complicanza della terapia sostitutiva, prevenibile utilizzando preparati commerciali contenenti fattore di von Willebrand (VWF). Lo scopo del lavoro è valutare la reattività del plasma di pazienti emofilici con inibitore, utilizzando diversi preparati commerciali di FVIII, correlando il titolo anticorpale con la generazione di trombina.

Materiali e metodi. È stato determinato il titolo anticorpale (MIU) del plasma di 11 pazienti con emofilia A utilizzando 4 concentrati di FVIII: Hemate e Fandhi (H e F, plasma derivati contenenti VWF), Hemofil (HM, Purificato), Kogenate (K, Ricombinante). S'è valutato il 50% del picco di generazione trombinica utilizzando i 4 differenti preparati.

Risultati. La mediana del titolo dell'inibitore è: H=23.5, HM=74.7, K=27.1, F=20.8. La variazione dei risultati in funzione della generazione del 50% di trombina è riassunta nel grafico 1.

Discussione e conclusioni. Utilizzando concentrati con VWF il titolo è inferiore rispetto a quelli privi ($p < 0.01$), dimostrando l'importanza del VWF nella stabilizzazione del FVIII e nella generazione di trombina.

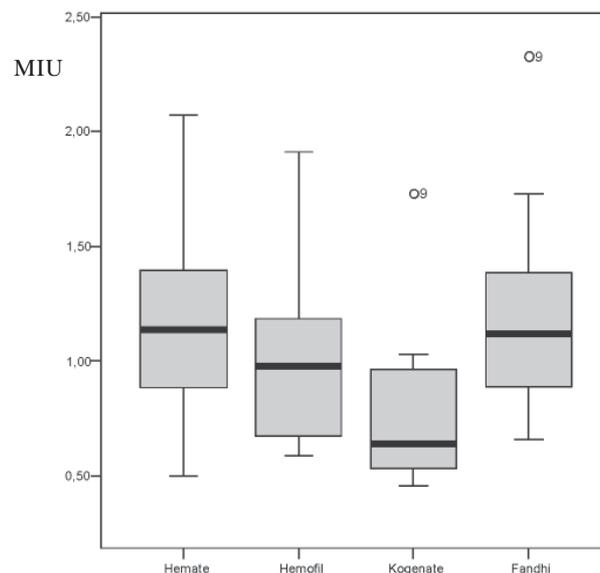


Grafico 1. Titolo anticorpale espresso in MIU necessario per ottenere il 50% della generazione di trombina per ciascun concentrato

VALUTAZIONE DEL RISCHIO TROMBOTICO NELLA POPOLAZIONE AFFERENTE ALL'AMBULATORIO TAO DELL'E.O. OSPEDALI GALLIERA DI GENOVA

A-28

Nanni L., Innocenti L., Mori I., Mori M.

S.C. Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, E.O. Ospedali Galliera, Genova

Scopo del lavoro. Nella Regione Liguria le malattie tromboemboliche rappresentano la principale causa di morte e di morbilità. Le malattie tromboemboliche costituiscono una problematica di rilevante importanza clinica ed epidemiologica e si manifestano principalmente come IMA, ictus, arteriopatie e tromboembolismo venoso. Numerosi sono i fattori di rischio per le malattie tromboemboliche: ambientali, metabolici, coagulativi; molti dei fattori di rischio sono acquisiti mentre altri sono congeniti. Questo studio mette in relazione gli eventi trombotici con i fattori di rischio, tralasciando la prevenzione primaria legata alla fibrillazione atriale ed altri fattori quali gravidanza, patologia oncologica, immobilizzazione prolungata, interventi chirurgici e traumi.

Materiali e metodi. Sono state raccolte e valutate casistiche cliniche diverse per quanto attiene le manifestazioni d'organo, ma accomunate dalla presenza di manifestazioni cliniche tromboemboliche costituite dai seguenti casi: a) Trombosi Venosa Profonda o Embolia Polmonare; b) arteriopatie cerebrali croniche; c) episodi cerebrovascolari acuti focali; d) arteriopatie periferiche; e) cardiopatia post ischemica. È stata predisposta una cartella clinica informatizzata per ogni paziente; i dati raccolti sono stati classificati percentualmente per i vari fattori di rischio.

Risultati. I pazienti afferenti al centro sorveglianza TAO nel periodo di riferimento (01/01/05-31/08/05) sono stati 1175, di cui 465 in terapia dicumarolica per esiti di malattia tromboembolica (264 T.V.P./E.P., 46 arteriopatie cerebrali croniche, 60 stroke/TIA, 16 arteriopatie periferiche, 79 cardiopatie ischemiche o post ischemiche). Di questi 286 pazienti (61,5%) sono stati indagati per i fattori di rischio trombotico (alterazione proteine coagulative C e S, omocisteinemia, mutazione fattori coagulativi II, V Leiden, MTHFR), in assenza di terapia con anticoagulanti orali ed a idonea distanza dall'evento acuto.

Si sono riscontrati i seguenti risultati: 48 casi con iperomocisteinemia, 21 con mutazione del fattore V Leiden, 13 con mutazione del fattore II, 8 con mutazione MTHFR, 11 con deficit di proteina S, 6 con deficit di proteina C coag., 8 con associazione iperomocisteinemia/mutazione fattore V Leiden, 3 con associazione iperomocisteinemia/mutazione F. II. Nei campioni presi in esame sono risultati 118 casi (41,2%) positivi per fattori di rischio congeniti, mentre 22 casi (7,7%) sono risultati positivi per fattori di rischio acquisiti.

Discussione e conclusioni. I pazienti afferenti all'ambulatorio TAO valutati per rischio trombotico hanno evidenziato una positività su base genetica, di gran lunga maggiore rispetto a quella basata su fattori acquisiti.

INDAGINE SULL'UTILIZZO DEL D-DIMERO NEI DIPARTIMENTI DI EMERGENZA ACCETTAZIONE DELLA REGIONE LAZIO

A-29

Federici N.*, Antonucci G., Di Tommaso G.***, Papa F.****, Gambetta C.***

*Laboratorio Analisi P.O.S.S.Spirito ASL RME,**Medicina di Laboratorio Az.O.S.Giovanni-Addolorata - Roma,***S.I.T Az.O.S.Giovanni-Addolorata Roma,****Ospedale Fatebenefratelli-Isola Tiberina Roma

Scopo del lavoro. E' stata condotta, nelle strutture Ospedaliere della Regione Lazio sede di Dipartimenti di Emergenza ed Accettazione (DEA) di I e II livello, un'indagine sulle modalità di utilizzo diagnostico del dosaggio del D-Dimero.

Materiali e metodi. Allo scopo sono stati predisposti due modelli di questionario a risposta chiusa: uno destinato all'area di laboratorio e all'altro all'area clinica. La maggior parte delle domande era comune ai due questionari ed indagava caratteristiche analitiche, applicazioni cliniche e rispetto delle raccomandazioni sull'uso del test. Un minor numero di domande era presente solo nel questionario destinato al laboratorio ed indagava le modalità del controllo di qualità.

Risultati. Sono stati fatti pervenire i rispettivi questionari ai responsabili dei DEA della Regione Lazio ed ai responsabili dei laboratori operanti nelle medesime strutture. Hanno risposto, 12 responsabili di laboratorio (86%) e otto responsabili di Dea (57%). Tutti i laboratori che hanno risposto eseguono il D-Dimero nel plasma; i dosaggi vengono eseguiti con differenti metodiche (Instrumentation Laboratory, 1 BioMerieux, 1 Organon Teknika, 2 Dade Behring, 2 Diagnostica Stago). Nell'area di laboratorio pur essendo presente una discreta conoscenza delle specifiche analitiche dei test utilizzati (il 58% indica correttamente sensibilità e specificità del metodo in uso) vi è una modesta attitudine al controllo analitico del dosaggio (CQI giornaliero eseguito dal 58% dei laboratori, VEQ dal 41%) ed una assenza di linee guida e/o protocolli interni. Nonostante sensibilità e specificità del metodo siano tarate sulla diagnosi di esclusione della tromboembolia venosa (TEV), solo in tre realtà il dosaggio del D-Dimero viene effettuato in caso di (TEV) o embolia polmonare (EP); nelle altre realtà il dosaggio viene effettuato anche in caso di sepsi, screening in gravidanza, cid e monitoraggio della terapia trombolitica, in alcuni casi senza l'utilizzo di cut-off differenziati. La raccomandazione delle società scientifiche di utilizzare il D-Dimero, nelle diverse strategie diagnostiche della TEV, a seconda della sensibilità e specificità dello stesso, viene generalmente disattesa sul versante clinico. I test vengono infatti utilizzati in alcuni casi senza una conoscenza delle relative specifiche con un rischio di una sottovalutazione delle reali potenzialità.

Conclusioni. Le raccomandazioni del consenso scientifico sull'utilizzo diagnostico del dosaggio del D-Dimero sembrano essere state accolte solo in modo parziale nei DEA della Regione Lazio.

ANALISI DELL'AUMENTO DI ASSORBANZA A TEMPO FISSO NEL TEST APTT, SU APPARECCHIO AMAX DESTINY, IN VARIE PATOLOGIE

A-30

Ferraro E.*, Battistoni F.*, Scarpa F.*, Bruno F.*, Diano D.°, Dicuonzo G.*

*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, Roma; °PRISMA srl, Usmate (MI)

Scopo del lavoro. Nello studio di plasmi provenienti da pazienti in Coagulazione intravascolare disseminata (CID) o in sepsi è stato descritto un fenomeno di improvvisa variazione di assorbanza durante la registrazione in continuo della reazione di aPTT in strumenti ottici. Si può ritenere che plasmi i quali mostrano un simile fenomeno sono indicativi di pazienti soggetti a tali patologie o a rischio per esse. L'apparecchio Amax Destiny, della Trinity Biotech, Irlanda, è dotato di un software che permette di analizzare il profilo di assorbanza a 405 nm durante la reazione di aPTT, quindi permette di osservare con relativa facilità, in contemporanea alla reazione di aPTT, il fenomeno di curva bifasica.

Materiali e Metodi. E' stato scelto di registrare l'aumento di assorbanza a 18 secondi dall'aggiunta di cloruro di calcio. In un gruppo di 50 pazienti normali privi di patologie conosciute, il valore di riferimento è risultato $0,98\text{mA} \pm 1,91$ (mA=milliunità di Assorbanza). La variabilità del metodo calcolata su un plasma scelto al limite di media + 3xDS (=7), è risultata la seguente: media within run $6,06 \pm 2,15$ e media tra giorni $6,27 \pm 3,41$. Tenendo conto della variabilità biologica e della variabilità del metodo si è ricavato provvisoriamente che un valore è da considerarsi certamente patologico quando supera 23,5 mA. Tra marzo e giugno 2005 sono stati analizzati 338 pazienti con 490 osservazioni. La media totale dei valori di aumento dell'assorbanza della popolazione dei pazienti è stata di 16,64 mA. I pazienti erano così suddivisi: cardiologia 73, medicina interna 29, oncologia 76, chirurgia generale 23, gastroenterologia 26, altri reparti 111.

Risultati. La media dell'aumento in mA di assorbanza era tra i cardiologici 14 mA (range 8-48,5), in oncologia 18 mA (range 8,4-78,5), in medicina interna 20,5 mA (range 8,30-53), in gastroenterologia 13,16 mA (range 8,2-33,9), in chirurgia generale 14,38 mA (range 7,90-29,60), in 10 casi di sepsi con emocoltura positiva la media era 23,03 mA (range 10,40-53). Nei reparti più rappresentati le percentuali di osservazioni patologiche (superiori a 23,5 mA) sul totale delle osservazioni sono state le seguenti: medicina interna 30,09%, oncologia 20,35%, cardiologia 6%. In pazienti con sepsi comprovata la percentuale di osservazioni patologiche è risultata pari al 41,66% (20 osservazioni patologiche su 48 determinazioni).

Discussione e conclusioni. Queste prime osservazioni sembrano confermare che questa nuova misura è utile nell'identificazione di pazienti a rischio di eventi di sepsi e probabilmente anche di coagulazione intravascolare.

UNA PIU' COMPLETA RISPOSTA AL PAZIENTE TROMBOTICO?**A-31****Fuduli V., Orrico F., Russo MG., De Luca S., Ledonne R.**

Patologia clinica, DMSC, Università Magna Græcia, Catanzaro

Scopo del Lavoro. La valutazione dei pazienti con malattie che alterano i processi coagulativi e che sono alla base di fenomeni trombotici, acuti e non facilmente trattabili, richiede specifiche indagini di approfondimento diagnostico. La disponibilità di metodologie analitiche, affidabili, di facile esecuzione e di costo contenuto, ci ha consentito di valutare l'appropriatezza del dosaggio del vWF e del PAI-1 nello studio di pazienti ad elevato rischio di eventi tromboembolici, al fine di rispondere con maggiore efficacia alle richieste dei clinici. vWF è una proteina multimerica, coinvolta nello spreading delle piastrine, nella loro adesione ed aggregazione, nell'attività del FVIII. Sono descritte numerose varianti cliniche, genetiche ed acquisite che comportano diminuita attività biologica di vWF. PAI-1, fisiologicamente controlla il processo fibrinolitico, ma elevati livelli circolanti inducono eventi trombotici, in particolare in pazienti oncologici, sottoposti ad interventi chirurgici maggiori, epatopatici e con shock settico.

Materiali e Metodi. Da una casistica molto più ampia, sono stati selezionati campioni di plasma prelevati da pazienti oncologici (13), nefrologici (26), con patologie del circolo periferico (30), neurologici (20). I campioni sono stati analizzati quotidianamente, in parallelo con la valutazione dei parametri coagulativi di base. vWF è stato dosato con metodologia automatizzata (Sta Liatest vWF, Roche Diagnostic) sulla strumentazione STA-C. PAI-1 è stato dosato con una metodologia immunoenzimatica, in semiautomatico, (Asserachrom, Roche Diagnostic).

Risultati. Sulla base dei dati acquisiti nel nostro laboratorio, l'attività del vWF viene espressa in tre ambiti di valori: 51-160% non patologici; 161-250% patologici; >251% francamente patologici. In base a questa classificazione hanno dato valori patologici: 9 (69.2%) dei pazienti oncologici, affetti da tumori solidi, in trattamento chemioterapico; 19 (73%) dei nefrologici, affetti da IRC; 12 (40%) dei pazienti con patologie del circolo vascolare periferico; 4 (20%) dei neurologici. Gli stessi pazienti hanno mostrato valori di PAI-1 superiori al cut-off di riferimento (43 ng/ml). Una paziente, con diagnosi di Malattia di vWF, ha mostrato i valori più bassi di vWF (31%) e di PAI-1 (9 ng/ml).

Discussione e Conclusioni. vWF è da ritenere un fattore di alterazione endoteliale il cui incremento risulta essenziale per l'attivazione protrombotica nei pazienti con patologie neoplastiche e/o vascolari. Pertanto, è appropriato il dosaggio del vWF sia per la diagnosi di elevato rischio trombotico sia per la valutazione del mantenimento dell'omeostasi endotelio-vascolare, come si evince dai dati ottenuti nei pazienti oncologici e nefropatici. Elevati valori di PAI-1 sono probanti di un ulteriore rischio trombotico.

UTILITÀ DEI TEST PER DIAGNOSI DI TROMBOFILIA IN UNA POPOLAZIONE SELEZIONATA CON TROMBOEMBOLISMO VENOSO**A-32****Leoncino S., Malatesti V., Intra E.**

Laboratorio Analisi OEI Genova

Scopo del lavoro: L'indagine è stata condotta sulla popolazione di 875 pazienti afferenti al centro TAO (TEV18%-valvulopatici19%-arteriopatici13%-FA45%-altre5%) per selezionare i casi di TEV che dovevano effettuare screening per trombofilia.

Materiali e metodi: Le determinazioni sono state effettuate su ACL-TOP e ACL-9000(IL®). Si sono calcolate incidenza e prevalenza, confrontando i risultati per categorie di sesso e età, individuando classi di pazienti in base al difetto riscontrato.

Risultati: in tabella.

Discussione e conclusioni: Definendo una popolazione selezionata di 140 pazienti con TEV si sono differenziati i casi idiopatici (prevalenza 0,29) dai secondari (prevalenza 0,71). Si sono selezionati i pazienti con TEV idiopatica utilizzando l'algoritmo di Wells e il D-D, per razionalizzare i costi degli accertamenti. I dati della prevalenza dei deficit sono più elevati rispetto a quelli della letteratura, relativi a popolazione non selezionata. E' necessario un percorso diagnostico adeguato a identificare i casi sui quali condurre accertamenti per trombofilia da affidare a centri specialistici. Considerando l'importanza medicolegale della diagnosi genetica, è necessaria la gestione appropriata dell'informazione al paziente e ai familiari per le sequele psicologiche, sociali e etiche che comporta.

CASI	TVP ISOLATA		TVP + EP		EP	
	I %	prevalenza	I %	prevalenza	I %	prevalenza
ATIII	5%	0,014	5%	0,014	0%	0
PC	0%	0	0%	0	0%	0
PS	5%	0,014	5%	0,014	0%	0
MUT II	37,5%	0,043	50%	0,072	0%	0
MUT V	62,5%	0,072	30%	0,043	100%	0,028
MUT II + V	25%	0,028	10%	0,014	0%	0
LAC	0%	0	20%	0,028	0%	0

REACTIVE OXYGEN METABOLITES (ROMs) IN MOTOR NEURON DISEASE**A-33****Metelli M.R., *Bongioanni P., Manzone F., Fulceri F., Puccetti C., Panicucci E., *Rossi B., Pietrini P.**

Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Experimental Pathology, *Neurorehabilitation Unit, Department of Neuroscience, University of Pisa, Italy.

Scopo del lavoro. Oxidative stress has been related to several neurodegenerative disorders. Unbalanced overproduction of reactive oxygen species may give rise to oxidative stress which induces neuronal damage, ultimately leading to cell death by apoptosis or necrosis. In the present study, we assayed blood reactive oxygen metabolites (ROMs) from patients affected by amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Materiali e metodi. According to the El Escorial revised criteria (Brooks et al., 2000), 39 patients (15 women and 24 men; mean age \pm SD: 61 ± 11 years) were subdivided into 3 groups: clinically possible (A), probable (B), and definite (C) ALS. Disease severity was scored by means of the ALS Functional Rating Scale (Cedarbaum and Stambler, 1997), and patients subgrouped accordingly into 3 classes (I: scores between 40 and 31; II: scores from 30 to 11; III: scores between 10 and 0). We assayed repeatedly over an one-year period ROMs levels in sera from patients and 20 healthy control subjects (mean age \pm SD: 56 ± 13 years). Blood samples were drawn in the morning, and serum assayed immediately by colorimetric determination [DIACRON s.r.l.].

Risultati. We found significantly ($p = 0.008$) increased ROMs in probable ALS patients compared to controls (364 U.CARR. vs 305 U.CARR.), but no significant differences in ROMs levels were observed between possible ALS patients and controls, neither among A, B, C patient subgroups. Significant ($p = 0.05$) differences in ROMs levels were found between Class II patients (338 U.CARR) and controls. By excluding possible ALS patients from calculations (and therefore taking into account only B and C patient subgroups), even more significant ($p = 0.03$) differences were observed between Class I (356 U. CARR) or Class II (349 U. CARR) and healthy controls; mean value of ROMs levels for Class III ALS patients was 389 U. CARR.

Discussione e conclusioni. Our data stand for enhanced oxidative stress in ALS, mirrored by raised ROMs generation. It seems that the most impaired patients have the highest mean values of ROMs, suggesting a correlation between disease severity and oxidative stress.

References

Brooks et al. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1(5):293-9, 2000
Cedarbaum and Stambler. J Neurol Sci 152(S):1-9, 1997

STUDIO DELL'ATTIVITA' DELLE CITOCINE NELLE MALATTIE CRONICHE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE**A-34****Argento R., Dardano A., Scarmozzino MG.**

Patologia Clinica, DMSC, Università degli Studi "Magna Græcia" Catanzaro

Scopo del Lavoro. I meccanismi molecolari del sistema immunitario, dopo il riconoscimento dell'antigene, sono regolati specificamente dall'attività delle sottopopolazioni linfocitarie Th1 e Th2. Th1, modulata da IL-2 e da IFN- γ , è responsabile dei meccanismi di citotossicità; Th2, modulata da IL-4 e da IL-10, è correlata con la risposta immunitaria umorale. Nell'ambito di un progetto più ampio condotto nel nostro laboratorio, presentiamo i dati del dosaggio in citofluorimetria dell'attività del *field citochinico* nei pazienti affetti da Sclerosi multipla o da Demenze neurodegenerative, al fine di rispondere in maniera completa ed aggiornata alla richiesta del clinico ed alle attese del paziente

Materiali e Metodi. In questa fase dello studio sono stati arruolati 91 pazienti adulti, di entrambi i sessi, di età compresa tra 15 e 90 anni, non ancora sottoposti a terapia specifica, con diagnosi clinica e strumentale di: 25, Sclerosi multipla; 36, M. di Alzheimer; 14, Demenza vascolare; 26 Demenza frontotemporale. In tutti i soggetti sono stati misurati i livelli plasmatici di IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ con metodica citofluorimetrica (CBA II, BD BioSciences) e di TGF- β mediante Elisa (Biosource).

Risultati. Tutti i pazienti affetti da SM hanno presentato valori di TNF- α superiori al cut-off. Due pazienti con demenza frontotemporale hanno mostrato valori elevati di TGF- β . I pazienti affetti da M. di Alzheimer non hanno mostrato valori elevati in nessun dosaggio. Elevati livelli di IL-6, segno di alterazione della barriera ematoencefalica, sono stati riscontrati in 14 pazienti affetti da MS, in 7 sofferenti di Demenza vascolare, in 10 con Demenza frontotemporale.

Discussione e Conclusioni. Il vantaggio della citofluorimetria è legato alla possibilità di dosare contemporaneamente un pattern citochinico, completo sul piano fisiopatologico e, quindi, di poter valutare le variazioni citochiniche complessive del paziente. Nella patogenesi della SM riveste grande importanza l'alterazione della risposta cellulo-mediata, con un prevalente "field" di tipo Th1. Il dosaggio delle citochine proinfiammatorie, in particolare IL-6, è appropriato per la valutazione di fase acuta e di progressione della malattia. Nella AD e nelle Demenze non-AD, TGF- β svolge un ruolo protettivo rallentando l'evoluzione della malattia. Eventuali incrementi stabili e significativi di IL-10 indicano un corretto effetto immunomodulante della terapia ed un'evoluzione più lenta della SM. L'algoritmo di laboratorio dei pazienti con malattie neurodegenerative dovrebbe, a nostro avviso, comprendere il dosaggio di IL-6, IL-10 e TGF- β in relazione al significato biologico e patogenetico di queste citochine e per una migliore definizione della diagnosi e della evolutività della malattia.

METODICA AUTOMATIZZATA PER LO STUDIO DEI WBC NEL LIQUOR**A-35**

Ruggeri M.*, Carboni A.*, Antonucci G.*, Bruno F.*, Cupillari D.*, Dicuonzo G.***, Forastiere E.*, Gemma A.T.*, Maida C.***

*AO S. Giovanni-Addolorata, **Campus Biomedico Roma

Scopo del lavoro: valutare l'affidabilità e le modalità più idonee per una accettabile conta automatica dei globuli bianchi(WBC) del liquido cefalo-rachidiano(LCR).

Materiali e metodi: sono state prese in considerazione 100 conte automatiche su campioni di LCR provenienti da vari reparti. Lo strumento utilizzato è l'ADVIA 120 dotato di chiave software per il conteggio dei WBC dell' LCR e lettura con sistema laser; il metodo utilizza un reagente sfericizzante e fissativo per le cellule e consiglia di diluire con PBS i campioni di LCR con più di 1500 RBC/μL, poiché potrebbero interferire nella conta dei WBC non garantendone l'accuratezza. Il controllo è stato eseguito con lettura ottica in camera di Nageotte.

Risultati: L'analisi statistica ha evidenziato che: la conta dei WBC sia elettronica che ottica non è distribuita normalmente; la conta degli RBC non è distribuita normalmente. Per quanto riguarda la conta dei WBC in relazione agli RBC: la conta elettronica dei WBC è in relazione significativa positiva con la conta degli RBC: retta di regressione $y=28,2662+0,0480X$ con una analisi della varianza che dà una P per l'F ritrovato < 0.001 ; invece la conta manuale non è dipendente dalla conta degli RBC. Tuttavia le conte manuali e quelle elettroniche sono correlate significativamente tra loro (test di correlazione per ranghi data la non normalità delle distribuzioni).

Discussione e conclusioni: l'analizzatore automatico mostra una significativa risposta nei valori più bassi di WBC liquorali, dove il campione appare soggettivamente "limpido ed incolore". Si può affermare che la metodica è valida, ma è necessario porre particolare attenzione al numero ed alle caratteristiche degli RBC, che in alcuni campioni presentano, pur non superando la conta di 1500, maggiore resistenza e non subiscono la totale sfericizzazione, tanto che potrebbero aumentare il valore dei WBC. L'ipotesi da noi posta è che alcuni RBC siano più resistenti alla sfericizzazione pertanto invadono la soglia del canale dei WBC.

ANTICORPI ANTI-RIBOSOMA P E PSICOSI LUPICA: UN CASO CLINICO CHE CONFERMA LA SPECIFICITÀ DELLA TECNICA DI IMMUNOBLOT**B-01**

Sabatini P.*, Giordano G.*, Tedesco A.R.*, Talento B.*, Danise P.***

*U.O.C. di Patologia Clinica; **U.O.C. di Malattie Infettive; D.E.A.II Umberto I- Nocera Inferiore - A.S.L.SA1

Scopo del lavoro: Il Lupus Eritematoso Sistemico è tra le patologie autoimmuni sistemiche, la più rappresentativa (0,1%) e tra le eventuali complicanze prevede manifestazioni neurologiche (VIII degli undici criteri ACR) del tipo psicotico (psicosi lupica 4-15%). Il percorso diagnostico utilizzato dagli autori evidenzia la stretta correlazione tra la presenza di anticorpi anti-ribosoma-P e lo sviluppo di psicosi lupica.

Materiali e metodi: Una donna (C.E.) di 34 anni si ricovera in ospedale per febbre elevata comparsa da oltre 30 giorni con faringodinia e dimagrimento, anemia marcata e leucopenia. La presenza di tali sintomi e dati di laboratorio impongono un approfondimento diagnostico strumentale e laboratoristico. L'esame clinico obiettivo risulta negativo. Gli esami strumentali (Rx torace, eco addome, ECG etc.) e i tests di laboratorio di routine, microbiologici e parassitologici non evidenziano alterazioni diverse da quelle del ricovero. Durante la degenza la paziente manifesta segni di squilibrio psichico (agitazione, insofferenza e facile irritabilità tali da indurla a tentativi di suicidio). L'approfondimento diagnostico di secondo livello (ricerca di target anticorpali con metodi di immunoblotting EUROLINE EUROIMMUN) evidenzia la positività degli anticorpi antinucleosomi anti-istoni e anti-ds DNA a conferma di quella degli ANA ad alto titolo, con pattern di tipo omogeneo, che associata all'evidenza clinica, correla verosimilmente con una M.A.I.S. Inoltre la positività per gli ab-antiribosoma P suggerisce una possibile complicanza del tipo psicosi lupica.

Risultati: I test sierologici utilizzati (IFI ed immunoblotting) per indagare sull'eventuale presenza di una M.A.I.S. hanno evidenziato: una positività per ANA, con metodi IFI su substrato di Hep-2 con pattern di tipo omogeneo e citoplasmatico simil-ribosomiale; una positività di tipo ribosomiale su stomaco di ratto ed una positività per ant-iribosoma P con metodica di immunoblotting di conferma.

Discussione e Conclusioni: Gli anticorpi ant-nucleo (ANA) e gli anti-ribosoma P consentono l'inquadramento clinico, dimostrando il valore semeiotico del dato di laboratorio e la sua utilizzazione per la definizione della strategia terapeutica (cortisone e ciclofosfamide a cicli), la cui efficacia è confermata dalla scomparsa della sintomatologia all'ingresso e dalla sensibile riduzione delle manifestazioni psicotiche evidenziate in corso del ricovero.

GLI ANTICORPI ANTI-LAMININA-1 SI ASSOCIANO AD ABORTO SPONTANEO MA NON HANNO VALORE PREDITTIVO SULL'ESITO DELLA GRAVIDANZA

B-02

Bizzaro N.¹, Matsuura E.², Villalta D.³, Antico A.⁴, Platzgummer S.⁵, Musso M.⁶

¹ Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo (UD); ² Department of Cell Chemistry Okayama University, Okayama, Giappone; ³ Immunologia e Virologia, A.O. Pordenone; ⁴ Laboratorio Analisi, Ospedale di Cittadella (PD); ⁵ Laboratorio Analisi, Ospedale di Merano (BZ); ⁶ Laboratorio Analisi, Ospedale di Cuneo.

Scopo dello studio. Il 50% circa degli aborti spontanei che si verificano tra la 8a e la 22a settimana di gestazione riconosce una causa immunologica. In molti casi, anticorpi anti-fosfolipidi (anticardiolipina, lupus anticoagulant) o anti-proteine associate ai fosfolipidi (anti- β 2 glicoproteina I, anti-annexina V e anti-protrombina) sono risultati associarsi ad aborto, ma studi prospettici non hanno evidenziato un loro chiaro ruolo patogenetico o prognostico. Per tale motivo, abbiamo studiato gli anticorpi anti-laminina-1, un nuovo marcatore immunologico associato ad aborto, effettuando uno studio prospettico per verificare se la positività degli anticorpi anti-laminina-1 all'inizio di gravidanza avesse valore predittivo per l'esito in aborto in donne sane. La laminina-1 è una glicoproteina di membrana che svolge un ruolo primario nell'embriogenesi, promuovendo l'adesione del trofoblasto al tessuto placentare materno.

Materiali e metodi. A 232 donne sane facenti parte di un precedente studio prospettico, 116 delle quali avevano avuto una gravidanza abortiva e 116 che avevano partorito (gruppo di controllo confrontabile per età e parità), sono stati misurati gli anticorpi anti-laminina-1 con un metodo immunoenzimatico home-made messo a punto all'Università di Okayama in Giappone, sui campioni di siero prelevati all'inizio della gravidanza.

Risultati. Anticorpi anti-laminina-1 sono risultati presenti nel 7.2% delle donne che hanno partorito e nel 12.9% di quelle con aborto. Tuttavia, la differenza non ha raggiunto la significatività statistica (chi-quadro 2.04; $P = .15$; odds ratio, 1.91; 95%CI 0.776-4.707; $P = .15$). Anche le concentrazioni anticorpali non sono risultate significativamente diverse tra i due gruppi ($P = .12$).

Discussione e Conclusioni. Come già verificato per altri autoanticorpi del gruppo degli anti-fosfolipidi, anche gli anticorpi anti-laminina-1 si associano probabilmente come epifenomeno ad aborto ma, quando misurati all'inizio di gravidanza, non sono predittivi di aborto in donne sane.

LA RISPOSTA DELLA MEDICINA DI LABORATORIO AL QUESITO CLINICO DI MALATTIA CUTANEA AUTOIMMUNE

B-03

Antico A., Siviero F., Bountis J., Scuccato G., Sartore P., Pandin M., Bacelle L.

Dipartimento di diagnostica di laboratorio, P.O. di Cittadella (PD), ULSS 15 Regione Veneto

Scopo del nostro studio: ottimizzare un algoritmo diagnostico che consenta al clinico di ben classificare le dermatopatie autoimmuni.

Materiali e metodi: da 11 mesi nel nostro laboratorio gli anticorpi anti cute si ricercano con il metodo di immunofluorescenza indiretta (IFI) come test di I° livello, utilizzando come substrato l'esofago di scimmia ed un coniugato policlonale. Come test di II° livello viene effettuata l'IFI usando coniugati specifici, anti IgA o IgG e sue sottoclassi; per distinguere gli anti membrana basale (MBZ) rivolti verso antigeni del tetto epidermico da quelli diretti contro strutture del pavimento dermico si esegue il "salt split skin test" su sezione di cute umana separata con soluzione salina 1M. I test di III° livello sono metodi ELISA o IMMUNOBLOT che espongono antigeni specifici presenti nella cute. I kit disponibili in commercio contengono Desmogleina 1 e Desmogleina 3, BP 230 (domain C terminale) e BP 180 (domain NC 16a).

Risultati e discussione: Se il test di I° livello è negativo, visti la sensibilità e l'elevato valore predittivo negativo, non vengono eseguiti i test successivi del percorso diagnostico. Se positivo il quadro fluoroscopico ci permette di distinguere gli anti cute in 2 principali gruppi autoanticorpali: contro la sostanza intercellulare dell'epidermide (anti ICS) che si riscontrano nel Pemfigo volgare (PV) e fogliaceo (PF); gli anti MBZ che si associano ai Pemfigoidi bolloso (PB) e cicatriziale (PC) e Dermatite di Duhring. I test di II° livello identificano l'isotipo oltre il target antigenico fornendoci ulteriori informazioni. Riguardo gli anti MBZ, se risultano IgG+ e IgG1- si deve eseguire il "Salt Split Skin" test. I risultati ottenuti dai test sopraindicati permettono di indirizzare gli esami di III° livello in modo mirato. La nostra casistica è ancora esigua ma i dati preliminari sono sovrapponibili ad altre esperienze presenti in letteratura: il metodo IFI di I° livello ha dimostrato una sensibilità dell'87%; gli anti ICS sono stati riscontrati nell'84% pazienti con PV, nel 66% di quelli con PF. Gli anti MBZ nel 86% dei casi di PB, nel 64% dei casi di PC. Il valore predittivo positivo del Salt Split Skin è risultato dell'87.5% per il PB, del 65% per il PC. Ottima specificità (93%) hanno dimostrato i metodi di III° livello.

Conclusioni: la predittività dimostrata dall'algoritmo proposto suggerisce che l'ottimizzazione delle metodiche consentirà non solo di ben classificare le malattie muco-cutanee a patogenesi autoimmune ma anche di standardizzare il monitoraggio della attività di malattia consentendo di rispondere esaustivamente al quesito posto dal clinico.

ANALISI DI 487 RICHIESTE DI TEST SIEROLOGICI PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE AUTOIMMUNI SISTEMICHE: EVIDENZA DI NUMEROSE INCONGRUENZE TRA RICHIESTE E RISULTATI OTTENUTI, CON NOTEVOLE INCREMENTO DEI COSTI. PROPOSTA DI INTERVENTO ATTIVO DEL LABORATORIO NEL PROCESSO DI RAZIONALIZZAZIONE

B-04

G. Morozzi, A. Simpatico, S. Cucini, G. Pucci, MR. Bacarelli, I. Martelli, M. Galeazzi

Dip. Med Clin e Sci Immunol Applicate, UOC.Reumatologia, Policlinico Le Scotte, Siena

Scopo del Lavoro: analizzare le richieste di test sierologici per malattie autoimmuni sistemiche, per: 1. razionalizzare le richieste; 2. contenere i costi; 3. applicare linee guida; 4. aumentare l'efficacia diagnostica; 5. favorire la comunicazione fra i diversi operatori sanitari; 6. suggerire un intervento attivo del laboratorio nel processo di razionalizzazione.

Materiali e Metodi: sono state analizzate 487 richieste provenienti dai vari reparti di degenza della Az. Osp. Univ. Senese, pervenute al laboratorio dal 1 Nov.04 al 28 Febb. 05, per i seguenti parametri: l'indicazione del quesito diagnostico, la tipologia degli esami richiesti, l'appropriatezza della cascata di test oltre lo screening sulla base di linee guida, la % di positività dei test e la congruenza sulla base del risultato ottenuto allo screening e del quesito diagnostico indicato. E' stata inoltre fatta un'analisi dei costi reali e dei costi ipoteticamente sostenuti rispetto a quelli che potevano essere se il laboratorio avesse potuto gestire le richieste indipendentemente da ciò che veniva indicato. *Risultati:* nel 76% dell'intero campione venivano contemporaneamente richiesti test di vario livello (fino al western blot), oltre agli ANA di screening, indipendentemente dal quesito diagnostico prospettato. Fra questi, nel 16,2% delle richieste non era indicato il quesito diagnostico, nel 10% delle richieste veniva indicato un singolo esame e solo nel restante 14% gli esami richiesti concordavano con il quesito diagnostico. Dall'analisi del campione risulta che il 68% dei campioni (331) risultava negativo all'ANA test; di questi il 76% (253) permaneva negativo alla cascata dei test successivi. 28 sieri ANA negativi risultavano positivi ai test di 2° e 3° livello per SSA a 52 e/o60 Kd; d'altro canto, 75 erano positivi allo screening ma negativi ai test successivi. Soltanto 34, cioè 7% del campione era ANA/ENA positivo e congruente con il sospetto diagnostico indicato; di questi il 41% proveniva dalla U.O.C. di Reumatologia. Dall'analisi dei costi risulta una spesa complessiva di euro 16406 a fronte di una ipotetica di 5645 euro "ragionata" e gestita dal laboratorio sulla base della positività allo screening ANA e al quesito diagnostico indicato.

Discussione e Conclusioni: Il laboratorio di autoimmunità sistemica ha presentato questo rapporto alla Direzione Sanitaria della AOU senese con l'autorizzazione ad entrare attivamente nel percorso diagnostico dei pazienti per i prossimi mesi. Le ricadute di tale atteggiamento sono in corso di valutazione.

ANTICORPIANTI-CCP E FR: DETERMINAZIONI A CONFRONTO PER LA DIAGNOSI DI AR

B-05

Bassetti D., *Paolazzi G., Nuzzo C., *Peccatori S., Caciagli P.

Dipartimento Med. di Laboratorio, Microbiologia-Virologia, *Attività Reumatologica, Ospedale S. Chiara, Trento

Scopo del lavoro. La ricerca degli anticorpi anti citrullina (CCP) ha assunto in questi anni un ruolo di fondamentale importanza nella diagnosi di Artrite Reumatoide, fornendo al Reumatologo un dato analitico dotato non solo di elevata specificità, come appariva dalle prime sperimentazioni, ma anche di buona sensibilità, soprattutto dopo l'introduzione di kit immunoenzimatici di II generazione, basati sull'utilizzo dell'antigene CCP-2 (peptide x10-cyc). Nell'intento di valutare l'impatto della ricerca di anti-CCP nella gestione del paziente con AR, è stato eseguito un confronto della stessa con la determinazione del Fattore Reumatoide, tradizionalmente usato nella diagnosi dell'affezione.

Materiali e Metodi. Nel siero di 290 pazienti, provenienti dal Servizio di Reumatologia dell'Ospedale S. Chiara di Trento per sospetto di AR, è stata eseguita la ricerca di anticorpi anti-CCP e RF, utilizzando rispettivamente il metodo immunoenzimatico (Quanta Lite CCP IgG-INOVA Diagnostics) e nefelometrico (N Latex RF-Dade Behring).

Risultati. Nei 290 campioni considerati sono stati evidenziati anticorpi anti-CCP (cut-off 20 U/ml) in 70 pazienti e positività per RF (cut-off 15 U/ml) in 107 pazienti; 167 campioni risultavano negativi ad entrambe le determinazioni. La valutazione clinica dei soggetti considerati (78 pazienti con AR e 212 non AR), ha consentito il calcolo di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN) delle ricerche utilizzate singolarmente, in alternativa od in modo combinato. Anti-CCP e RF hanno dimostrato risultati concordanti nel 76% dei pazienti; i dati discordanti si riferivano a 69 pazienti, 16 positivi solo per anti-CCP e 53 solo per RF. Tutti i campioni con positività isolata per CCP erano relativi a pazienti AR, mentre solo 8 AR si riferivano alle positività esclusive per RF.

Discussione e Conclusioni. La determinazione anti-CCP con le performances analitiche evidenziate (sens. 89, spec. 100, VPP 100, VPN 96) nei confronti della sola ricerca RF (sens. 79, spec. 78, VPP 97, VPN 91), si propone come valido strumento utile per la diagnosi: si evidenzia in particolare come il 20% delle AR considerate avesse presentato solo una positività anti-CCP. In base ai risultati ottenuti, si può concludere che l'uso combinato di anti-CCP e RF aumenta in modo significativo la sensibilità diagnostica dei test immunologici nei pazienti con sospetto di AR.

DIAGNOSI DI INFEZIONE LATENTE TUBERCOLARE: NUOVI TEST PER VALUTARE LA RISPOSTA DEI LINFOCITI T

B-06

Golato M.¹, Bianco I.¹, Gargiulo L.¹, Di Luca F.¹, Sichetti L.², Salutati P.¹

¹ Patologia Clinica P. O. - U. O., ² Pediatria P. O. Lanciano

Scopo del lavoro: l'infezione da Mycobacterium tuberculosis (M. T.) con 1/3 di popolazione infetta, rappresenta un grave problema nel mondo (WHO). Considerati i limiti dell'intradermoreazione di Mantoux (TST) per la diagnosi di infezione latente di M. T. (depressione della risposta dopo vaccinazioni con virus vivi, terapie corticosteroidee, infezioni virali, false negatività nei neonati, necessità di standardizzare il risultato, iperreattività, cross-reattività con BCG e micobatteri non tubercolari) abbiamo utilizzato per la diagnosi di infezione latente due tecniche recenti, basate sulla risposta cellulo-mediata dei linfociti CD4 e CD8: il T SPOT-TB e il Quantiferon (QFT) che rilevano l'Interferon-g (IFG) prodotto da linfociti T venuti a contatto con antigeni specifici (Ag) del M. T.: l'ESAT-6 l'CFP-10 e TB7. 7.

Materiali e metodi: dopo diagnosi di tubercolosi attiva in un'operatrice sanitaria della nursery, sono stati esaminati, per possibile contatto, 39 neonati e 12 operatori sanitari a rischio infettivo. Sono stati eseguiti: test TST, T SPOT-TB e QFT. Il TST (Biocine-Chiron) è stato eseguito come da metodica. Per il QFT (cellestis) è stato eseguito prelievo di 1ml di sangue in due provette eparinate (una con Ag specifici adesi alle pareti ed una per il controllo negativo) con misura dell'IFN-g in ELISA (UI/mL) sulla base di doppia curva standard (coefficiente-correlazione curva standard ³ 0.98, coefficiente-variabilità £ 15%, limite sensibilità 0.05 UI/ml). Per il T SPOT-TB (Oxford Immunotec): 4 ml di sangue in vacutainer CPT_m, separazione dei mononucleati e conteggio automatico (Advia-120-Bayer) su pellet in terreno AIM V per l'idoneità dei campioni (minimo 2.5 cells x 10⁵); l'IFN-g se prodotto, origina uno spot rappresentante l'impronta di una cellula T sensibilizzata. La lettura degli spot, eseguita al microscopio (5x), è stata valutata in riferimento al controllo negativo con spot £ 5 con controllo positivo ³ 20 spot. I tempi di determinazione dei test sono stati: tempo 0 (due mesi dal contatto) e dopo 1 e 6 mesi in cui è stata fatta profilassi.

Risultati: dei 12 adulti, 9 sono risultati negativi a tutti i test; uno con TST di 5 mm, T-SPOT QFT negativi; 2 positivi: il 1° con TST di 10 mm, QFT 0.88 UI/ml, T-SPOT: ESAT-6 spot 10, CFP-10 spot 23; il 2° con TST 10 mm, QFT 1.08 UI/ml, T-SPOT: ESAT-6 spot 7, CFP-10 spot 0; i 39 neonati sono risultati negativi ai 3 test.

Conclusioni: i nuovi test, nei casi analizzati, concordano con il TST in 50 campioni mentre in un adulto con TST dubbio sono risultati negativi. Questi test sensibili, specifici e soprattutto standardizzabili per la diagnosi di infezione latente tubercolare, permettono di superare molti dei limiti che il TST presenta, assumendo una notevole importanza nella strategia della limitazione del rischio infettivo e nel follow-up clinico.

PREVALENZA DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-PEPTIDE CICLICO CITRULLINATO IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI SISTEMICA PROGRESSIVA

B-07

Tampoia M.* , Iannone F.°, Marrone MP.°, Loidice L.* , Zucano A.* , Fontana A.* , Lapadula G.°, Pansini N.*

*Laboratorio di Patologia Clinica I, Policlinico di Bari; ° Cattedra di Reumatologia, Policlinico di Bari

Scopo del lavoro. Valutare la prevalenza degli autoanticorpi anti-peptide ciclico citrullinato (anti-CCP) in pazienti affetti da Sclerosi Sistemica Progressiva (SSP).

Pazienti e Metodi. 60 pazienti, 59 femmine ed 1 maschio, affetti da SSP, in accordo ai criteri ACR, con età media 51,03 anni (range 27-86) e durata media di malattia 8,13 anni (range 6mesi-43 anni), reclutati da un unico centro specialistico reumatologico. La presenza di autoanticorpi anti-CCP è stata valutata mediante metodica immunoenzimatica (Immunoscan RA, Eurodiagnostica), completamente automatizzata su analizzatore ETIMAX (DiaSorin). Il Fattore Reumatoide IgM (FR-IgM) è stato determinato mediante metodica nefelometrica.

Una valutazione clinico-specialistica è stata effettuata su tutti i pazienti, al momento del prelievo, circa l'eventuale presenza di poliartrite cronica e, nei casi positivi, è stata eseguita diagnostica strumentale radiologica (Rx mani e piedi). L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il chi-square test e il t-Student test. Sono state considerate significative differenze ad un valore di p<.05.

Risultati. 12 dei 60 pazienti (20%) presentavano all'esame clinico-obiettivo poliartrite cronica; di questi 7 (58,7%) riportavano erosioni articolari radiologicamente documentate e contemplavano i criteri ACR per la diagnosi di Artrite Reumatoide. Per essi è stata fatta diagnosi di AR associata a SSP. Delle 53 pazienti affette da SSP, 3 (5,6%) hanno presentato positività alla ricerca di autoanticorpi anti-CCP, 25 (47,1%) hanno presentato positività al FR-IgM e 3 (5,6%) ad entrambi gli autoanticorpi. Dei 7 pazienti con AR associata a SSP 6 (85,7%) sono risultate positivi agli autoanticorpi anti-CCP; la settima paziente è risultata negativa sia agli autoanticorpi anti-CCP che al FR-IgM.

Conclusioni. I nostri dati hanno indirettamente riconfermato le buone performances analitiche (sensibilità e specificità) del test anti-CCP. Infatti hanno evidenziato che la maggior parte dei pazienti affetti da SSP risulta negativa agli autoanticorpi anti-CCP (elevata specificità, 94,4%) e che il dosaggio degli autoanticorpi anti-CCP associato all'attenta valutazione clinica dei pazienti con poliartrite cronica può permettere di identificare un gruppo di pazienti affetti da overlap syndrome, SSP associata ad AR (buona sensibilità, 85,7%).

DOSAGGIO DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-PEPTIDE CICLICO CITRULLINATO (ANTI-CCP) NEL MONITORAGGIO DI PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE REUMATOIDE

B-08

Zucano A., Tampoia M., Fontana A., Maggiolini P., Petrelli MC., Pansini N.

Laboratorio di Patologia Clinica I, Policlinico di Bari

Scopo del lavoro: valutare i livelli sierici circolanti degli autoanticorpi anti-peptide ciclico citrullinato (anti-CCP) in pazienti affetti da artrite reumatoide in trattamento con Infliximab.

Pazienti e Metodi: sono stati studiati 28 pazienti affetti da Artrite Reumatoide (AR), classificata secondo i criteri ACR (1987), di cui 23 femmine e 5 maschi, di età media 41.7 anni (range 20-68) in trattamento con Infliximab.

Per tutti i pazienti è stata effettuata una valutazione clinica con Disease Activity Score (DAS28) ed è stato eseguito il dosaggio degli autoanticorpi anti-citrullina (anti-CCP) e del fattore reumatoide (FR) al tempo 0, dopo 6 e 30 settimane di trattamento. Il dosaggio degli anticorpi anti-CCP è stato eseguito con metodica immunoenzimatica quantitativa (Immunoscan, RA, Eurodiagnostica); il dosaggio del fattore reumatoide isotipo IgM (FR-IgM) con metodica nefelometrica.

Risultati: i valori della mediana del DAS 28 sono stati: 4.86, 2.36, 2.00 rispettivamente al tempo 0, dopo 6 e 30 settimane di trattamento. La riduzione di tali valori è risultata statisticamente significativa dopo 30 settimane di trattamento ($p < .0001$). I valori della mediana dei livelli sierici di anticorpi anti-CCP sono stati: 193 U/ml, 171 U/ml, 117 U/ml rispettivamente al tempo 0, dopo 6 e 30 settimane di trattamento. La riduzione di tali valori non è stata statisticamente significativa ($p = .06, ns$) dopo 30 settimane di trattamento.

I valori della mediana dei livelli sierici di FR-IgM sono stati: 32 UI/ml, 25 UI/ml, 17 UI/ml rispettivamente al tempo 0, dopo 6 e dopo 30 settimane di trattamento. La riduzione dei valori della mediana dei livelli sierici di FR è stata statisticamente significativa ($p = .01$) dopo 30 settimane di trattamento.

Conclusioni: La riduzione dei livelli sierici di FR è risultata più significativa rispetto a quella dei livelli sierici di anti-CCP. Probabilmente il trattamento con farmaco inibitori del TNF-alfa blocca la produzione dei due autoanticorpi in maniera differente e con tempi diversi. Pertanto studi prospettici su casistiche più ampie e soprattutto a più lungo termine sono necessari per valutare l'utilità del monitoraggio degli autoanticorpi anti-CCP in pazienti affetti da AR in trattamento.

Bibliografia: Bobbio-Pallavicini F, Alpini C, Caporali R, Avasse S, Bugatti S, Montecucco C. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(3):R264-72.

AUTOANTICORPI ANTI-RNA POLIMERASI III: UN NUOVO TEST DIAGNOSTICO PER LA SCLERODERMIA

B-09

Tozzoli R.^a, Kodermaz G.^a, Morozzi G.^b, Codullo V.^c, Platzgummer S.^d, Tonutti E.^e, Bizzaro N.^f, Bassetti D.^g, Tampoia M.^h

^aDipartimento dei Servizi, Laboratorio Analisi, Ospedale di Latisana (Ud); ^bIstituto di Reumatologia, Siena; ^cIstituto di Reumatologia, Pavia; ^dLaboratorio Centrale, Merano (Bz); ^eImmunopatologia ed Allergologia, Udine; ^fPatologia Clinica, Tolmezzo (Ud); ^gPatologia Clinica II, Trento; ^hPatologia Clinica I, Bari
Forum Interdisciplinare per la ricerca nelle malattie autoimmuni (FIRMA)

Scopo del lavoro. La sclerodermia è patologia autoimmune caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi specifici, costituiti principalmente dagli anti-topoisomerasi (TopoI Ab) ed anticentromero (ACA); circa 1/3 dei pazienti sclerodermici non presenta questi autoanticorpi, ma altri meno frequenti, rilevabili solo con metodi non commerciali e a fini di ricerca. Scopo del presente lavoro è stato di valutare la sensibilità di un nuovo test ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-RNA polimerasi III (RNAPIII Ab) in pazienti sclerodermici sieronegativi per autoanticorpi maggiori, provenienti da 8 diversi centri italiani, di confrontare i risultati con quelli forniti dal metodo di riferimento (radio-immunoprecipitazione-RIPA) e di correlare la loro presenza con quadri clinici specifici della malattia.

Materiali e metodi. Sono stati studiati complessivamente 395 pazienti, di cui 207 affetti da sclerodermia (172 TopoI Ab/ACA negativi e 35 TopoI Ab/ACA positivi) e 188 pazienti di controllo (71 soggetti sani e 117 affetti da altre malattie reumatiche). È stato impiegato un metodo immunoenzimatico in fase solida (Anti-RNA Polymerase III ELISA kit, MBL, Nagoya, JPN), che utilizza come antigene RNA polimerasi ricombinante. Il valore soglia di positività è stato fissato a 11.2 U/mL mediante l'impiego di curva ROC. Come metodo di confronto è stato impiegato il metodo RIPA home-made con 35S-metionina.

Risultati. Al valore soglia considerato, la sensibilità diagnostica (intesa come percentuale di risultati positivi sui pazienti sclerodermici (TopoI Ab-ACA negativi) è risultata del 26,7%, la specificità diagnostica del 95%.

Nessuno dei pazienti sclerodermici positivi a TopoI Ab/ACA è risultato positivo al test RNAPIII Ab.

L'analisi della concordanza con il metodo di riferimento ha prodotto una sensibilità analitica del 100%, ed una specificità del 98%. La presenza di RNAPIII Ab è correlata prevalentemente, ma non esclusivamente, con la forma diffusa della malattia (67%).

Discussione e conclusioni. Il test per RNAPIII Ab con metodo immunoenzimatico presenta un'elevata accuratezza analitica, paragonabile a quella del metodo di riferimento, e una specificità diagnostica adeguata. Con il nuovo metodo la ricerca di questo autoanticorpo diventa routinariamente possibile nel laboratorio clinico e consente di diagnosticare circa il 30% dei soggetti con sclerodermia sierologicamente negativi.

EPATITE AUTOIMMUNE IN ETÀ PEDIATRICA: REPORT DI DUE CASI A SIEROLOGIA NEGATIVA

B-10

Alessio M.G., Torre G.*, Sonzogni A.°, Bravi M*., Stroppa P*., Carminati V., Munegato G., Baigorria M., Bertoletti A., Di Gristina M., Maestroni C., Pagani A., Piazza P., Redaelli A., Trotta A.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, *U.O. Pediatria, °U.O. Anatomia Patologica - A.O. "Ospedali Riuniti" di Bergamo

Introduzione. L'Epatite Autoimmune (AIH) è una causa rara di epatite in età pediatrica, ad eziologia sconosciuta, con una frequenza del 1-2% di tutte le epatiti. AIH di tipo I è caratterizzata da positività per ANA e/o ASMA mentre AIH di tipo 2 presenta positività per ab. anti-LKM e/o anti Liver Cytosol 1. Altri autoanticorpi (anti citoplasma dei neutrofili-ANCA, anti Soluble Liver Antigen -anti SLA, anti recettore dell'asialoglicoproteina-ASGP-R), possono più raramente essere rilevati in corso di AIH, da soli o associati con gli autoanticorpi "classici". La diagnosi viene posta in base al riscontro di ipertransaminasemia, ipergammaglobulinemia, positività degli autoanticorpi e presenza alla biopsia di un quadro istologico di "piecemail necrosis" e di infiltrato infiammatorio, dopo esclusione di altre cause note di epatite. Nell'adulto, circa il 20% di AIH possono essere autoanticorpi-negative mentre nel bambino non esistono dati di stima del fenomeno.

Case Report. Noi presentiamo due casi di AIH a sierologia negativa, in due bambini giunti al nostro centro con diagnosi di "epatite fulminante di ndd". In un caso era presente familiarità per patologie autoimmuni. Il quadro di ingresso era quello di una grave epatite con marcata ipertransaminasemia, ittero colostatico, alterazione dei parametri coagulatori ma assenza di ipergammaglobulinemia e negatività alla ricerca degli autoanticorpi (ANA, ASMA, LKM, LC1, SLA, ANCA, ASGP-R, Anti mitocondrio, anti DNA, anti istoni, anti cromatina, anti actina F). Tutte le altre possibili cause di epatite (virale, tossica, metabolica), erano escluse. La biopsia epatica mostrava, in un caso, la presenza di un massiccio infiltrato infiammatorio linfoistiocitario, con aggressione flogistica dei dotti biliari, epatite di interfaccia e "spotty necrosis": la terapia steroidea associata ad azatioprina, immediatamente instaurata, portava a rapida normalizzazione del quadro clinico-laboratoristico, confermando con criterio ex-iuvantibus la diagnosi di AIH. Nell'altro caso, il quadro biotipico era analogo ma mostrava un danno più grave, con scomparsa pressochè totale degli epatociti e proliferazione di strutture duttulari biliari. La comparsa di grave encefalopatia rendeva necessario il trapianto di fegato, perfettamente riuscito. Attualmente, entrambi i bambini stanno bene.

Conclusioni. La negatività degli autoanticorpi, in un quadro di epatite non riconducibile ad altre cause note e in presenza di un reperto biotipico suggestivo, non può essere utilizzato come criterio di esclusione per la presenza di AIH in età pediatrica.

ANTICORPIANTI -ASGP-R NELLA DIAGNOSI DELLE EPATOPATIE E NEL FOLLOW UP POST TRAPIANTO DI FEGATO IN ETÀ PEDIATRICA

B-11

Alessio M.G., Munegato G., Torre G.*, Bravi M., *Stroppa P., Carminati V., *Baigorria M., Bertoletti A., Di Gristina M., Maestroni C., Pagani S., Piazza P., Redaelli A., Trotta A.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e *U.O. Pediatria, A.O. "Ospedali Riuniti", Bergamo

Introduzione: Il recettore dell'asialoglicoproteina è un recettore di membrana, presente sulla superficie degli epatociti; autoanticorpi contro ASGP-R sono stati descritti in malattie infiammatorie epatiche, specie nell'epatite autoimmune (AIH), come espressione di autoimmunità "locale" e con un possibile ruolo nel monitoraggio della risposta terapeutica.

Scopo del lavoro: Abbiamo iniziato uno studio su bambini che afferiscono al nostro Centro Trapianti di Fegato, per valutare l'utilità degli ab. anti ASGP-R 1) in fase diagnostica, nel discriminare tra forme autoimmuni e altre patologie epatiche 2) nel monitoraggio della risposta alla terapia dell'AIH 3) nel discriminare tra due complicanze del post trapianto, il rigetto cronico e l'epatite autoimmune "de novo", che richiedono terapie diverse ma hanno problemi di diagnostica differenziale.

Materiali e Metodi: Ab anti ASGP-R sono stati determinati con un kit commerciale (Anti ASGP-R, Generic Assays GmbH, Alifax, Padova). Ad oggi, sono stati studiati 11 bambini: 4 con epatite autoimmune (due AIH tipo II-LKM1 ed LC1 positivi, due a sierologia negativa; uno trapiantato) e 7 con altre diagnosi (Alagille, atresia vie biliari, epatite fulminante di ndd; tutti trapiantati).

Risultati: nessuno dei 7 pazienti non AIH era positivo alla ricerca degli ab. anti ASGP-R, sia prima che dopo trapianto. Dei quattro pazienti con AIH, i due con "AIH a sierologia negativa" erano negativi anche a questo test mentre gli altri due risultavano positivi; in uno di questi pazienti, i livelli autoanticorpali all'esordio e su tre sieri raccolti dopo l'inizio della terapia, mostravano una progressiva riduzione, fino alla completa negativizzazione, in accordo con l'andamento clinico. Nei due pazienti con complicanze post trapianto, appartenenti al gruppo non AIH e negativi all'esordio, positività per ab. anti ASGP-R è stata rilevata nel paziente con epatite autoimmune "de novo" mentre il paziente con rigetto cronico è rimasto negativo.

Conclusioni: su una casistica limitata di pazienti pediatrici afferenti al nostro centro, la ricerca degli ab anti-ASGP-R ha mostrato 1) una minima utilità nella diagnostica dell'AIH, limitata dal riscontro di positività solo in associazione con i marcatori tradizionali 2) un comportamento interessante nel monitoraggio della risposta terapeutica, limitatamente all'unico caso valutato 3) un risultato promettente circa la possibilità di utilizzo nel discriminare tra rigetto cronico ed epatite autoimmune "de novo". Questi incoraggianti risultati andranno confermati su una casistica più ampia.

VALUTAZIONE COMPARATIVA DI ANTICORPI ANTI-CCP, ANTI-CHERATINA E FR NELLA DIAGNOSTICA DELL'ARTRITE REUMATOIDE

B-12

Bonaguri C.¹, Russo A.¹, Battistelli L.¹, Caleffi A.¹, Perini R.¹, Vezzosi C.¹, Bacciottini F.², Friggeri M.², Monica C¹

¹Lab. Analisi Emato-Chimiche Azienda Ospedaliera Parma; ²Dip. Medicina Sperim. Università degli Studi Parma

Scopo del lavoro. L'Artrite Reumatoide (AR) è una malattia autoimmune sistemica ad eziologia non ben definita che presenta un importante livello di morbilità. La diagnosi rimane spesso empirica soprattutto nelle fasi precoci della malattia e si basa principalmente su manifestazioni cliniche con un limitato supporto sierologico. Il test sierologico routinariamente usato è la determinazione del fattore reumatoide (FR) i cui livelli sono significativi in circa l'80% di pazienti con AR; tale marker presenta però problematiche di specificità risultando positivo anche in pazienti affetti da altre malattie autoimmuni, da infezioni virali, ecc. . Scopo del lavoro è stato confrontare su una serie di sieri i risultati forniti dalla ricerca del FR con la reattività sierologica verso altri autoantigeni al momento studiati, in particolare anticorpi anti-peptidi ciclici citrullinati (CCP) e anticorpi anti-cheratina (AKA).

Materiali e metodi. Sono stati considerati nello studio 217 sieri pervenuti consecutivamente al Laboratorio nel periodo Gennaio-Dicembre 2004 nell'ambito della diagnostica dell'AR. Tutti i sieri sono stati valutati per FR, anti-CCP, VES e PCR. 38 campioni sono stati caratterizzati anche per AKA. Il FR è stato valutato con metodica nefelometrica (Behring), la determinazione degli AKA è stata effettuata in immunofluorescenza indiretta (IFA) (IMMCO Diagnostics/Alifax) e il dosaggio degli anti-CCP è stato realizzato con un test ELISA (Euro-diagnostica/Alifax) considerando positivi valori e²25 UI/mL.

Risultati. La percentuale di concordanza positivi/negativi per FR e anti-CCP è risultata 87.6% (190/217). Tutti i casi discordanti (27/217) erano rappresentati da pazienti positivi per FR e negativi per anti-CCP. Di questi 6 erano affetti da altre malattie autoimmuni, 2 da patologie neoplastiche e 6 da infezioni croniche mentre 13 sono stati effettivamente diagnosticati come AR. L'analisi dei 38 casi valutati anche per AKA ha mostrato una concordanza elevata fra le determinazioni AKA e anti-CCP (92.1%;35/38) sovrapponibile a quella osservata per AKA e FR (92.1%;35/38).

Discussione e Conclusioni. I dati del nostro studio indicano una buona associazione FR e anti-CCP che si conferma un marker dotato di elevata specificità e di discreta sensibilità per AR. Il test AKA ha fornito una buona performance diagnostica pur presentando a nostro avviso alcune problematiche legate alla soggettività nella lettura dei preparati in IFA. L'uso combinato dei dosaggi anti-CCP e FR per le differenti caratteristiche di sensibilità e specificità mostrate unitamente alla facilità di esecuzione potrebbe effettivamente risultare di utilità nella diagnostica della AR.

DOSAGGIO IMMUNOGLOBULINE A, G, M, E NEI PAZIENTI CELIACI ACTTG POSITIVI

B-13

Loiodice L., Fontana A., Tampoia M.

Laboratorio Patologia Clinica I Policlinico Bari

Scopo del lavoro: valutare le alterazioni del dosaggio delle immunoglobuline G, A, M, E in pazienti affetti da malattia celiaca per interpretare eventuali aumenti delle IgE e/o deficit IgA e/o variazioni delle IgG e delle IgM.

Materiali e Metodi: Sono stati valutati 29 pazienti, affetti da malattia celiaca, risultati positivi all'Ac antiTG IgA e/o IgG e agli EMA dei quali 23 femmine e 6 maschi (F/M 3,83); 24 bambini e 5 adulti, afferenti al nostro laboratorio dalla pediatria, dall'ambulatorio e dalla gastroenterologia nel periodo tra marzo e giugno '05. I bambini e sono stati divisi in varie fasce di età per valutare la positività all'aumento delle IgE ed i soggetti adulti sono stati raggruppati in una fascia di età a partire dal superamento della soglia dell'età pediatrica: tra i pz pediatrici da 0 mesi a 1 anno, di età media 6 mesi, è stato individuato 1 pz (3.44%); 14 pz sono compresi nella fascia tra 1 e 5aa con età media 2,5 aa (48.27%); 5 pz tra 6aa e 9aa con età media 7,5aa (17.24%); 4 pz tra 10-15 aa di età media 12,5 aa (13.8%); degli adulti 5 pz hanno età compresa tra 16-42aa con età media 29 aa (17.24%). Le Ig sono state testate con metodica immunonefelometrica Dade-Behring su BN2, gli Ac antiTG con metodica immunoenzimatica Eurospital su Vela e gli EMA con immunofluorescenza in modalità manuale. I pz celiaci selezionati sono 14 positivi al test Ac antiTG IgA e IgM, 14 al Ac antiTG IgA ed 1 al Ac antiTG IgM e sono tutti EMA+.

Risultati: Le variazioni delle immunoglobuline riscontrate sono state valutate in relazione ai valori di riferimento per fascia di età: dai dosaggi è emerso che solo 1 paziente adulto presenta un deficit assoluto di IgA (3,44%), 1 pz ha una riduzione delle IgG (3,44%) e l'aumento delle IgE è presente in 7 soggetti (F/M 2,5) 1 compreso nella fascia di età tra 1 e 5 aa; 2 tra 6-9aa; 2 tra 10-15aa; e 2 pz, gemelle di età compresa tra 16-42aa, cui si rileva anche un aumento delle IgM. Si è potuta rilevare una percentuale di pazienti con positività agli Ac antiTG ed associato aumento delle IgE che è del 24,13%.

Conclusioni: Nella nostra casistica circa un quarto dei pz celiaci presenta un notevole aumento delle IgE che ci dà conferma dell'utilità del loro dosaggio in questa patologia e della possibilità di associazione della m. celiaca con l'atopia o l'asma. Valutata e confermata anche l'associazione con il deficit di IgA. Si è, pertanto, rilevata la necessità di studiare ulteriormente, anche in senso allergologico, i soggetti celiaci.

Bibliografia: Ludvig M. Sollid - Coeliac Disease Dissecting a complex Inflammatory Disorder Nature Reviews Immunology Volume 2 Sett. '02; Greco L ed al. - Atopy and celiac disease: bias or true relation? Acta Paediatr. Scand '90; 79:670-4

BORRELIOSI DI LYME: APPLICAZIONE DI UN NUOVO PROTOCOLLO SIEROLOGICO**B-14****Rorai E.*, Fonda M.*, Scaini M.T.***, Trevisan G.***, Serafin M.*, Gasperi S.*, Giglio I.*, Biasioli B.***

*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti di

Trieste", **Dipartimento di Scienze Cliniche Morfologiche e Tecnologiche, Università degli Studi di Trieste

Scopo del lavoro. In una zona di forte endemia per la malattia di Lyme il laboratorio di sierologia deve affrontare due tipi di problemi. Il primo riguarda la scelta di test adeguati per sensibilità e specificità da mettere in relazione con la diversa distribuzione geografica delle diverse genospecie: B.b. sensu stricto, B.garini, B.afzelii; il secondo evidenzia la necessità di razionalizzare le richieste per carenza di linee guida nell'approccio diagnostico alla borreliosi di Lyme da parte dei medici e per la difficoltà pratica di comunicare e interagire con il laboratorio. Le richieste, di provenienza diversa, (reparti ospedalieri, territorio, Case di cura) sono solo raramente accompagnate da anamnesi e notizie cliniche e la possibilità di reperire tali dati da parte del laboratorio risulta spesso difficile. Si è reso pertanto necessario ricordare quanto suggerito dalle Linee Guida e dalla letteratura recente riguardo l'opportunità, i tempi e i modi per richiedere la sierologia per la Borrelia e in collaborazione con il Centro Regionale di Riferimento per la malattia di Lyme abbiamo stabilito un protocollo di lavoro allo scopo di evitare inutili ripetizioni e di fornire al clinico un quadro il più esauriente possibile tenendo conto anche della complessità antigenica della Borrelia. Il protocollo prevede test di 1° livello, test di 2° livello e il dosaggio degli anticorpi anti proteina VlsE, proteina di recente identificazione altamente specifica, il cui dosaggio viene utilizzato per il follow-up della malattia.

Materiali e metodi: Test di 1° livello: dosaggio anticorpi anti Borrelia IgG e IgM con metodica EIA in micropiastra che utilizza antigeni ricombinanti delle tre genospecie di B. burgdorferi (Mikrogen, distribuito da DiaSorin). Test di 2° livello: conferma della positività con metodica Immunoblot che utilizza antigeni ricombinanti delle tre genospecie di B. burgdorferi (Mikrogen, distribuito da DiaSorin). Test per il dosaggio degli anticorpi anti proteina VlsE con metodica CLIA che utilizza un antigene ricombinante (Mikrogen, distribuito da DiaSorin). Il protocollo da aprile 2005 è applicato alle richieste della routine. Tutti i sieri EIA positivi sono stati testati con il test di Immunoblot per la conferma della specificità e se presente la banda VlsE è stato eseguito il test quantitativo per tali anticorpi.

Risultati: Il principale risultato ottenuto è stato quello di fornire referti esaustivi a fronte di ogni richiesta di anticorpi anti Borrelia, evitando ripetizioni di prelievi per necessari test di conferma e l'inutile esecuzione di quelli non giustificati da una positività EIA. Sono aumentati inoltre significativamente i colloqui telefonici e la collaborazione con i medici. Da aprile ad agosto abbiamo testato 1500 pazienti, eseguito 343 test di conferma IgG, 272 test di conferma IgM e 383 dosaggi VlsE molti dei quali corrispondono a casi seguiti nel tempo, risultato del nostro lavoro di collaborazione con i clinici e con i medici del territorio.

Discussione e Conclusioni: Dopo un periodo iniziale di non poche difficoltà pratiche, considerata la vasta e molteplice utenza, e quindi la difficoltà nel far recepire il messaggio in modo chiaro data la sua complessità, a distanza di pochi mesi possiamo ritenere di essere arrivati a un buon punto per quanto riguarda la razionalizzazione dell'approccio diagnostico del morbo di Lyme. Già a quattro mesi dall'applicazione del protocollo possiamo correlare alcuni casi di diminuzione del valore VlsE con un esito positivo della terapia e remissione della sintomatologia clinica anche se i dati della letteratura parlano di una significativa riduzione del valore di questo parametro a sei mesi dalla terapia. Da questo lavoro di collaborazione ci si aspetta la conferma del significato del dosaggio degli anticorpi anti VlsE e la validazione del protocollo di lavoro.

VALUTAZIONE DI TEST SIEROLOGICI PER LA MALATTIA CELIACA**B-15****Caroli S., Frassi M., Manfredini E., Fasani AM., Marchetti G.**

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia. A.O. Istituti Ospitalieri di Cremona.

Scopo del lavoro. Il test di riferimento (gold standard) per la diagnosi di Malattia Celiaca (MC) è la biopsia intestinale. Recenti dati della letteratura riportano come la ricerca di anticorpi specifici presenti nel siero dei pazienti consente di ridurre il numero delle biopsie intestinali. Questi anticorpi di classe IgA, anti-tTG e anti-EMA, risultano avere un elevato valore predittivo per MC, sia nella diagnosi che nel monitoraggio della malattia. Scopo del lavoro, con una indagine di tipo retrospettivo, è stato quello di valutare l'efficacia dell'algoritmo presentato nelle linee guida sulla Rivista Italiana di Medicina di Laboratorio, per l'utilizzo di test diagnostici in soggetti con segni/sintomi di MC, escludendo la ricerca degli anticorpi anti-tTG IgG come test di primo livello.

Risultati. Sono pervenute 968 richieste per anti-tTG, 475 di queste anche per EMA. Settantaquattro pazienti (7,6 %) sono risultati positivi a uno o più test sierologici. I 74 soggetti presentavano quadri diversi: 42 presentavano positività per EMA IgA e per tTG IgA e vi era l'indicazione per la biopsia; 9 soggetti presentavano positività per tTG IgA ma non per EMA IgA (riguardavano appunto follow-up). Quarantuno pazienti presentavano positività per anti-tTG IgG, di questi: 18 anche per EMA IgA e per tTG IgA, mentre negli altri 23 positivi risultavano assenti gli Ab anti-tTG IgA e EMA IgA. Per i 23 pazienti con la sola positività per anti-tTG IgG è stato determinato il dosaggio quantitativo delle IgA totali nel siero, che è risultato per tutti > 5 mg/dl, escludendo soggetti con deficit assoluto di IgA. Per questi non vi è l'indicazione per la biopsia e sono generalmente monitorati con controlli della sierologia ogni 6 mesi-1 anno.

Conclusioni. L'analisi retrospettiva ha dimostrato il limitato impiego degli anticorpi anti-tTG IgG nella diagnostica della MC per l'elevato numero di falsi positivi in pazienti con altre patologie, così come nei soggetti sani. Gli Ab anti-tTG hanno valore predittivo in pazienti con deficit di IgA totali. I dati in nostro possesso confermano quanto indicato dalle più recenti linee guida: la ricerca con metodi EIA degli anticorpi anti-tTG di classe IgA e il dosaggio delle IgA totali rappresentano ora la prima indagine per la diagnosi di malattia celiaca.

GOVERNO CLINICO DEI TEST DI LABORATORIO PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI TOXOPLASMOSI IN GRAVIDANZA

B-16

Antico A., Siviero F., Bountis J., Scuccato G., Sartore P., Pandin M., Bacelle L.

Dipartimento di diagnostica di laboratorio, P.O. di Cittadella (PD), ULSS 15 - Regione Veneto

Scopo del nostro studio: ottimizzare un percorso diagnostico ragionato che, applicando i test di ultima generazione e di vario livello di indagine in sequenza logica, consentisse di migliorare l'efficacia diagnostica dell'infezione da toxoplasma gondii nella gravida e/o di collocarla in un arco di tempo preciso e/o stabilire se la malattia abbia interessato il feto.

Materiali e metodi: sono stati effettuati e valutati più di 30.000 test nell'arco di 3 anni presso il nostro laboratorio per la ricerca degli anticorpi anti toxoplasma di tipo IgG ed IgM (test di I° livello); sono stati eseguiti con metodica immunologica a cattura con sistema di rivelazione in chemiluminescenza in una popolazione non selezionata di gravide che afferivano al nostro ospedale dove si effettuano circa 2500 parti/anno. Alle donne con quadro sierologico compatibile con infezione da toxoplasmosi è stato eseguito il test di avidità delle IgG specifiche per l'antigene toxoplasmico, test di II° livello (doppia metodica immunologica a cattura: test normale e con aggiunta di tampone in grado di scindere i legami a bassa affinità); le gravide con quadro di infezione recente, contratta in gravidanza, sono state sottoposte ad indagine invasiva per ricerca del DNA del parassita nel liquido amniotico con metodo "polymerase chain reaction" presso un centro di riferimento regionale (test di III° livello).

Risultati e discussione: indicazioni emerse: i test di I° livello vanno eseguiti tra 8-10^a settimana di gravidanza. Il soggetto immune non necessita di ulteriori esami; il soggetto non immune deve eseguire gli esami di I° livello ogni mese; il soggetto con infezione in atto o recente deve essere sottoposto entro 48 ore ad indagini di II° livello. In caso di bassa avidità in qualsiasi epoca gravidica, alta avidità dopo la 24^a settimana o avidità intermedia dopo la 13^a, l'infezione verosimilmente è stata contratta in gravidanza. Alla donna deve essere immediatamente somministrata la terapia antibiotica ed effettuata la diagnosi prenatale invasiva tra la 18-21^a settimana di gravidanza. Alta avidità prima della 24^a settimana o avidità intermedia prima della 13^a settimana depongono per una infezione pregressa alla gravidanza senza nessun rischio fetale, necessità di indagini di III° livello o terapia.

Discussione e Conclusioni: Il nostro algoritmo diagnostico è la dimostrazione concreta del ruolo che il medico di laboratorio deve svolgere oggi nell'ambito della modernizzazione della medicina: rispondere al quesito che il clinico pone tramite la richiesta di esami interpretando il reperto analitico, commentandolo in modo da trasformarlo in referto da utilizzare per una strategia diagnostica e terapeutica adeguata.

ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS (AOPP) PER MONITORARE LO STRESS OSSIDATIVO ED UN POSSIBILE STATO INFIAMMATOIO CRONICO IN UN GRUPPO ETEROGENEO PER ETÀ DI SOGGETTI CON TRISOMIA 21

B-17

Corsi-Romanelli M.M.1, Massaccesi L.2, Herrera C.2, Dogliotti G.1, Pianta D.1, Licastro F.3, Goi G.2

1 Istituto di Patologia Generale, Laboratorio Patologia Clinica, Facoltà di Medicina, Università di Milano; 2 Dipartimento di Chimica e Biochimica Medica, Facoltà di Medicina, Università di Milano; 3 Dipartimento di Patologia Sperimentale, Laboratorio di Immunologia, Facoltà di Medicina, Università di Bologna.

Scopo del lavoro. Nel 1996 è stato introdotto un nuovo biomarker chiamato advanced oxidation protein products (AOPP), trovato per la prima volta nel plasma di pazienti uremici, e poi in pazienti emodializzati e in quasi tutti i pazienti con insufficienza renale cronica. È stato visto come ad un aumento degli AOPPs era correlato un aumento dei livelli di proteina C reattiva, e di neopterina. In questo lavoro, abbiamo voluto studiare in un modello di stress ossidativo quale quello della Sindrome di Down (SD), con pazienti di diversa età (giovani, adulti, anziani), gli AOPPs.

Materiali e Metodi. Sono stati studiati soggetti SD, divisi in tre gruppi di differente età: giovani n.23 (2-14 anni), adulti n.14 (20-50 anni) e anziani n.13 (>60 anni). Come popolazione di controllo abbiamo utilizzato n.15 soggetti apparentemente sani. Abbiamo dosato la proteina C reattiva in nefelometria, la neopterina con metodica ELISA (BRAHMS, Berlin, Germany), e le AOPP in spettrofotometria (ImmunDiagnostik, Bensheim, Germany).

Risultati. I livelli di neopterina risultano non differenti dai controlli (Controlli 7.02 ± 2.35 nmol/L; SD 7.05 ± 1.95 nmol/L, $p > 0.05$). I valori di proteina C reattiva risultano più elevati nei soggetti SD rispetto ai controlli (Controlli 1.34 ± 0.30 mg/L; SD 5.64 ± 3.52 mg/L, $p < 0.01$). I valori di AOPP nei soggetti SD non risultano differenti dai controlli (Controlli 57.14 ± 15.69 mM/L; SD 52.95 ± 22.40 μ M/L, $p > 0.05$).

Discussione e Conclusioni. I nostri dati non evidenziano uno stato infiammatorio nei pazienti SD alle differenti età, e rispetto ai controlli sani. La neopterina indice di infiammazione cronica, non è alterata, e gli AOPP, presenti in caso di stress ossidativo in corso di infiammazione cronica, non sono alterati. Dai nostri dati, appare che solo la proteina C reattiva risulta più elevata nei pazienti SD; tuttavia già in altri nostri lavori, avevamo evidenziato una alterazione della proteina C reattiva, collegata ad uno stato di attivazione endoteliale, senza le caratteristiche di uno stato proinfiammatorio, o addirittura pre-aterosclerotico, essendo la SD un modello "atheroma-free". Gli AOPP sembrano essere implicati maggiormente in condizioni di stress ossidativo dovuto a stati di infiammazione cronica, legati ad una attivazione cellulo-mediata, tipo monocito-macrofagica, di natura principalmente infettiva.

VELOCITÀ DI ERITROSEDIMENTAZIONE (VES) CORRETTA PER LA CONCENTRAZIONE DI GLOBULI ROSSI: MODELLO MATEMATICO DI STIMA PER TEST-1: Σ -VES

B-18

Pizzolato U., Giavarina D., Capuzzo S., Fortuna F., Urbani L., Soffiati G.

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

E' riportato in letteratura che la correzione della VES per i valori di ematocrito (HCT) aumenta la sensibilità e la specificità del test per le malattie infiammatorie. La correzione dei campioni è procedura lunga, laboriosa e rischiosa per gli operatori. Scopo di questo lavoro è valutare se esiste una relazione costante tra HCT, concentrazione di Emoglobina (Hb) e VES misurata con metodologia Test-1T e proporre una formula per la stima.

Sono stati arruolati nello studio 236 soggetti, 128 soggetti erano donne (età media 62+/- 20, intervallo 2-95 anni) e 108 soggetti erano uomini (età media 64+/- 20; i. 5-97). Dopo la misura della VES (Test-1T, Alifax, Padova, Italy) dell'HCT e dell'Hb (SE 2100, Sysmex, Kobe, Japan), a seconda che l'HCT fosse maggiore o minore di 0.35 L/L, una quantità di plasma $X = [(HCT/35) - 1/mL]$ è stata aggiunta o tolta dal campione. Eliminati gli outlier, si è determinata la relazione tra le variabili mediante regressione multipla (MedCalc®). Il confronto tra i valori di VES e di Σ -VES è stata effettuata con regressione secondo Passing e BaBlok e confronto grafico delle differenze medie, secondo Bland e Altman.

La regressione multipla sui 213 campioni rimanenti dimostra la seguente relazione:

$$\Sigma\text{-VES} = -58,77642 + 1,05628 * \text{VES} + 292,578 * \text{HCT} - 3,98425 * \text{Hb}$$

I risultati di Σ -VES stimati dall'equazione sono stati confrontati con i rispettivi valori di Σ -VES sperimentali. La correlazione tra le due variabili è risultata di 0,96 (95% CI da 0,95 a 0,97) $P < 0,0001$. L'analisi delle differenze medie dimostra un bias nullo (CI: da -0.98 a 0.98) e limiti di concordanza da - 14.5 mm/h (95% CI: da -16.2 a -12.8) a 14.5 mm/h (95% CI: da 12.8 a 16.2). L'analisi di Bland e Altman per differenze percentuali mostra un difetto di stima per valori fino a 10 mm/h.

E' noto da tempo che la VES è influenzata dalla concentrazione dei globuli rossi presenti nel campione. La possibilità di correggere i campioni per l'ematocrito è difficilmente praticabile nella routine di laboratorio. Il modello matematico proposto può costituire un'alternativa. Il bias tra Σ -VES sperimentale e quella stimata risulta uguale a zero. I limiti di concordanza variano di ± 15 mm/h. Questo valore non è da considerare elevato, se si osserva che le VES ottenute con il metodo TEST 1 ha dei limiti di concordanza con Westergren di circa 38mm/h, indicando una discreta variabilità. L'analisi della variazione in percentuale, sembra mostrare un problema di stima per i valori bassi. Questo ha scarso interesse clinico, non provocando variazioni di classificazione dei pazienti: oltre i 10 mm/h le differenze mantengono un bias costante anche in percentuale.

VALUTAZIONE DEL CONTEGGIO LEUCOCITARIO NEL LIQUIDO CEFALO-RACHIDIANO CON CONTAGLOBULI XE-2100

B-19

Giavarina D., Capuzzo S., Secco G., Bevilacqua A., Indico S., Soffiati G.

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

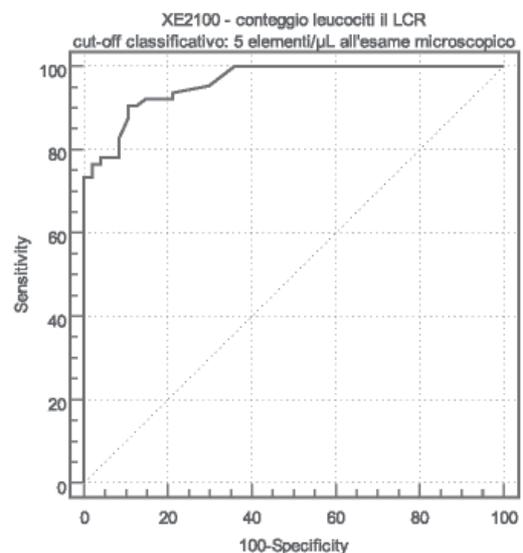
Scopo del Lavoro. I contaglobuli di ultima generazione sono proposti recentemente per il conteggio dei leucociti anche nel liquido cefalo-rachidiano (LCR). Scopo di questo lavoro è valutare le performance del contaglobuli XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) relativamente alla possibilità di omettere il conteggio in camera di Nageotte.

Materiali e Metodi. 111 campioni consecutivi di LCR sono stati analizzati secondo le raccomandazioni del produttore su un contaglobuli XE-2100 e quindi depositati in camera di Nageotte per la conta leucocitaria, eseguita da operatori esperti. I risultati sono stati analizzati sulla curva operativa caratteristica (ROC). Il cut-off per i campioni positivi è stato posto a 5 elementi/ μ L.

Risultati Dei 111 campioni, 64 presentavano un conteggio al microscopio $>$ di 5 elementi, con una prevalenza di positività per questo test del 57.7%.

Conclusioni. L'area sotto la curva ROC per i conteggi da XE-2100 era di 0.962 (95% CI: 0.907 a 0.989). La specificità rimaneva del 100% fino ad un cut-off $>$ 4 elementi, mentre la sensibilità raggiungeva il 100% a 39 elementi. (Figura).XE-2100 ha dimostrato un bias medio di 14 elementi (95% CI, 7-21), con una concordanza al 95% da -62 a 90 cellule.

L'analisi della curva ROC dimostra un'ottima classificazione dei campioni positivi e negativi, rispetto all'esame microscopico. L'analisi del bias dimostra invece marcate differenze nella precisione dei conteggi. Allo stato attuale, il conteggio automatico può essere utilizzato come screening: ad un cut-off $<$ 5 leucociti, nessun campione è risultato positivo al riesame microscopico.



**L'IMPORTANZA DEL LABORATORIO NELLA DIAGNOSI E NELLA GESTIONE DEL PAZIENTE
CON MALATTIA INFIAMMATORIA CRONICA INTESTINALE: DATI PRELIMINARI**

B-20

Golato M.¹, Spadaccini A.², Silla M.², Ferrini G.³, Larcinese G.³, Gargiulo L.¹, Indino F.¹, De Luca F.¹, Salutari P.¹
¹ Patologia Clinica P. O. Lanciano U. O. ; ² Gastroenterologia P. O. Vasto ; ³ U. O. Gastroenterologia P. O. Lanciano

Scopo: la calprotectina fecale è una proteina presente in grandi quantità nel citoplasma dei granulociti neutrofili, che la rilasciano se attivati da fenomeni infiammatori. Scopo del lavoro è fornire un indirizzo al clinico, attraverso il dosaggio della calprotectina, per la diagnosi differenziale tra Sindrome dell'intestino irritabile (IBS) e Malattia infiammatoria cronica intestinale (MICI) e per valutare lo stato di attività della malattia nei pazienti con Colite Ulcerosa e Morbo di Crohn, riservando le tecniche strumentali isto-endoscopiche a casi selezionati.

Materiali e metodi: in collaborazione con le U. O. di Gastroenterologia abbiamo analizzato 38 pazienti di cui 21 con sospetta IBS (negativi per infezioni intestinali e intolleranze alimentari), 17 con MICI diagnosticata, (4 con M. di Crohn e 13 con C. ulcerosa) ed in trattamento. Per la determinazione della calprotectina fecale è stato utilizzato il kit Calprest (Eurospital), con metodo immunoenzimatico, calcolo della concentrazione contro curva standard ed espressione in mg/Kg di feci, cut-off > 50 mg/Kg.

Risultati: dei 21 pazienti con sospetta IBS, 16 hanno mostrato livelli di calprotectina <50 mg/Kg e negatività isto-endoscopica; 5 livelli >200 mg/Kg: 3 endoscopicamente negativi (di cui uno con trombocitemia essenziale) sono stati inseriti in un protocollo di monitoraggio clinico e laboratoristico con riesame della sintomatologia, prelievi ripetuti a 3, 6, 12 mesi allo scopo di valutare una falsa positività o una patologia organica misconosciuta, 2 devono essere sottoposti ad endoscopia; dei 17 pazienti con MICI diagnosticata e in trattamento, uno in remissione totale dal punto di vista istologico e clinico ha mostrato livelli < 50 mg/Kg e 16, con apparente controllo terapeutico, hanno continuato ad avere livelli alti di calprotectina fecale (> 2000 mg/Kg quelli con malattia attiva, con valori tra 300 e 1500 mg/Kg le remissioni). Tutti i 16 pazienti sono stati inseriti nel protocollo clinico e laboratoristico per la valutazione dello stato di attività della malattia.

Conclusioni: i dati preliminari hanno dimostrato che il test rappresenta un valido supporto al clinico per lo screening tra patologie funzionali e croniche intestinali; nei pazienti con MICI diagnosticate ed in trattamento risulta importante per il monitoraggio terapeutico e soprattutto per seguire l'attività della malattia, valutando il rischio di recidiva. L'utilizzo del test calprotectina può contribuire, per la sua efficacia diagnostica, a migliorare l'assistenza, limitando il ricorso a tecniche invasive strumentali e a rendere il patologo clinico soggetto attivo nella gestione del paziente.

**DIFFERENZA TRA CONCENTRAZIONI DI PROCALCITONINA (PCT) IN SEPSI
DA BATTERI GRAM NEGATIVI E DA GRAM POSITIVI E CORRELAZIONE
CON CONCENTRAZIONI DI PROTEINA C REATTIVA (PCR)**

B-21

Battistoni F.*, Gavasci M.*, Bruno F.*, Graziano N.*, Antonacci C.*, Ferraro E.*, Spoto S.*, Ruggeri M.^o, Dicuonzo G.*

* Medicina di Laboratorio e fisiopatologia clinica, Università Campus Bio-Medico, Roma; ^oUOD Medicina di laboratorio, Azienda Ospedaliera S Giovanni- Addolorata, Roma

Scopo dello studio. Una percentuale di sepsi che varia dal 30 al 50% non ha la prova dell'isolamento del germe; la PCT e la PCR sono proposte come tests surrogati di sepsi. E' stata studiata la possibilità di differenziare le sepsi da Gram+ e da Gram- con questi due tests.

Materiali e metodi. Le concentrazioni di PCR e PCT sono state determinate, con il metodo TRACE su Kryptor(DASIT), in 91 sepsi accertate microbiologicamente: la distribuzione degli isolamenti ed i risultati di PCR e PCT, riferiti al giorno di massimo valore della PCT, sono riportati nella tabella seguente.

Agenti causali	totali	PCT (ng/mL)			PCR (mg/L)		
		media	DS	mediana	media	DS	mediana
tutti	91	20.86	55.32	3.5	174.33	135.87	155.7
Gram +	36	7,47	14,45	1,21	174,31	148,38	153,7
Gram -	38	27,95	51,10	11,62	183,32	136,39	173,45
Funghi	6	3.92	5.64	1.53	99.5	54.45	98.3
polimicrobiche	11	50.1	122.02	5.61	184.1	122.93	125.5

Risultati. Le concentrazioni di PCT in sepsi da Gram- differivano in maniera significativa da quelle di sepsi da Gram+ (test di Wilcoxon P<0,0001) mentre le concentrazioni di PCR non differivano nei due tipi di eziologie.

Discussione e conclusioni. La PCT, a valori superiori a 20 ng/ml suggerisce una batteriemia da batteri Gram-, mentre non vi è correlazione tra valori di PCR ed eziologia della sepsi; non vi è correlazione tra i valori di PCT e quelli di PCR nelle sepsi.

CARATTERIZZAZIONE DI COMPONENTI MONOCLONALI SIERICHE IN PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE SOLIDO

B-22

Bruno F.*, Imbalzano G.*, Ferraro E.*, Vitali S.*, Valente M.*, Bonanni F.*, Maida C.°, Battistoni F.*, Petitti T.*, Ruggeri M.°, Dicuonzo G.*

*Università Campus Bio-medico ° A.O. S. Giovanni-Addolorata Roma

Scopo del lavoro. La presenza di componenti monoclonali (CM) in elettroforesi sierica di pazienti (pz) affetti da tumore solido non linfatico è di frequente riscontro. La caratterizzazione di queste CM riveste un interesse non solo legato alla elettroforesi stessa ed ai suoi significati, ma può avere anche un significato patogenetico e forse prognostico. Abbiamo studiato sieri di pz oncologici con CM, per caratterizzarle e studiarne l'eventuale associazione con molecole sieriche dell'infiammazione in confronto a sieri di pz oncologici senza CM.

Materiali e metodi. Sono stati raccolti i sieri di 59 pz oncologici affetti da un tumore solido non linfatico, cui era stata eseguita una elettroforesi sieroproteica su gel di agarosio (SEBIA) e che al momento del prelievo avevano presentato una piccola CM nel tracciato. Come gruppo di controllo abbiamo utilizzato i sieri di 60 pz oncologici con le stesse caratteristiche che non presentavano CM. Il gruppo dei pz con CM era così strutturato: età media 68 aa (SD 11), 33M, 26F; 20/59 avevano un tumore dell'apparato genitourinario, 28/59 del digerente, 11/59 altri; 51/59 avevano metastasi. Nel gruppo di controllo età media era 60 aa (SD 12,4), 19/60 M, 41/60 F; 26/60 avevano un tumore dell'apparato genitourinario, 29/60 del digerente, 5/60 altri; 47/60 avevano metastasi. Su tutti i 159 pz sono stati dosati C3, C4, RF, CRP, orosomucoide (immunoturbidimetria). Sui pz con CM sono state dosate anche IgG, IgA, IgM, catene leggere ϵ e δ , (immunoturbidimetria) ed eseguita immunofissazione sierica (SEBIA) per tipizzare le CM.

Risultati. Dei 59 pz con CM, 47 presentavano all'ispezione visiva dell'IFE un quadro da immunocomplessi e 19/59 avevano un ϵ/δ patologico ($<1,15$; $>2,9$); 16/59 avevano valore di C3 patologico, 6/59 di C4, 14/59 di RF (di cui 2 con epatite C), 17/59 di CRP, 15/59 di orosomucoide, 36/59 almeno un indice infiammatorio patologico. Dei 60 pz del gruppo di controllo 50/60 avevano un valore di C3 patologico, 9/60 di C4, 14/60 di CRP, 5/60 di RF (di cui uno con epatite C), 14/60 di orosomucoide, 28/60 presentavano almeno un indice infiammatorio patologico. Sui sieri di tutti i pz con RF positivo è stata eseguita la Waaler-Rose che ha dato esito negativo. L'analisi statistica con la regressione logistica permette di affermare che sia la presenza di RF, sia la diminuzione del C4 sono correlate alla presenza di CM sierica, indipendentemente dall'età e dall'epatite C, malgrado la presenza di CM sia fortemente correlata con l'età.

Conclusioni: Si può ritenere che le CM sieriche in pz oncologici siano legate a immunocomplessi, i quali non sono presenti in pz senza CM: occorrerà correlare questo dato alla prognosi.

UN CASO DI ANAFILASSI ALL'UOVO DI QUAGLIA

B-23

Rosengart L., Madella C., Piccone G., Alessandri C., Galeotti C., Scarcella A.

Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini Roma

Scopo del lavoro: L'ipersensibilità all'uovo è una causa comune di allergia alimentare nei bambini. Esiste cross reattività tra le varie proteine dell'uovo dei gallinacci. Sono state fino ad ora descritte cross reattività sierologiche ma non reazioni cliniche all'uovo di quaglia. Descriviamo un caso di anafilassi all'uovo di quaglia in un bambino sensibilizzato all'uovo di gallina.

Materiali e metodi: D.G. bambino senza familiarità allergica, allattato al seno per sei mesi. Manifestava dermatite atopica all'inserimento di latte di mucca e uovo nella dieta. Vengono quindi eliminati; e a dodici mesi è stato possibile reinserire il latte ma non l'uovo per la persistente positività del prick test e delle IgE specifiche (29,5 KUA/l). A tre anni manifestava rinite ed asma per sensibilizzazione alle polveri. A cinque anni è arrivato in ospedale per un episodio di rash angioedematoso, rinocongiuntivite ed affanno insorti immediatamente dopo sfregamento del viso con le mani venute a contatto con uova di quaglia usate dalla madre perché consigliate dal medico. I sintomi regredivano in trenta minuti dalla somministrazione di antistaminico intramuscolo e terapia broncodilatatoria. Prick - prick test positivo all'albumine e al tuorlo dell'uovo sia di gallina che di quaglia. Skin prick test (Stallergeres SA Fresnes Paris) per l'uovo di gallina e IgE specifiche (Pharmacia UPJOHN AB Uppsala) fortemente positive, mentre non esistono IgE specifiche per le proteine dell'uovo di quaglia. Abbiamo esaminato 25 bambini atopici di cui 15 con allergia all'uovo di gallina (15 all'albumine 13 anche al tuorlo) con PPT positivo

Risultati: Tutti i bambini PPT positivi all'uovo di gallina avevano PPT positivo all'uovo di quaglia (per entrambi albumine e tuorlo). Nessuno dei bambini PPT negativi è risultato PPT positivo all'uovo di quaglia (Spearman correlation 1:0: $P < 0,0001$).

Discussione e conclusioni: Sono stati descritti severi casi di allergia alle proteine dell'uovo sia da contatto sia da inalazione. Galline e quaglie appartengono alla stessa famiglia, questo suggerisce la possibile presenza di epitopi cross reattivi tra le due specie di uccelli, come già descritto per altri tipi di uova di uccelli. Non essendo stato possibile eseguire diete di esclusione e reintroduzione, non si può avere la certezza clinica.

CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE CON GEL SEPARATORE: EFFETTI SUL DOSAGGIO DELLE IgE TOTALI

B-24

M. Negri, E. Marzot, D. Giavarina, G. Soffiati

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia-Ospedale "S.Bortolo"-Vicenza

Scopo del lavoro. Verificare la stabilità delle IgE totali (tIgE) in campioni mantenuti per più giorni in tubo primario con gel separatore dopo centrifugazione.

Materiali e metodi. Su 111 campioni prelevati in provetta con gel separatore (Vacutainer SST TM Gel e attivatore coagulazione - Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), centrifugati e non sierati abbiamo dosato le tIgE (sistema UniCAP1000 - Sweden Diagnostics S.r.l., Milano, Italia) il giorno stesso del prelievo, dopo 7 e dopo 14 giorni di permanenza a +4°C.

Risultati. Il range dei livelli di tIgE considerati era di 3,4- 2262 kUI/L. Il bias valutato secondo Bland and Altman è risultato pari a -3,6% (Intervallo di Confidenza 95%: -5,2 a -2,0) dopo 7 giorni e pari a -8,4% (95% CI: -9,8 a -6,9) dopo 14 giorni. I limiti di concordanza a 7 giorni erano da -19,6% a +12,4%; a 14 giorni da -23,3% a +6,6%. La variabilità analitica del test, valutata calcolando il CV% di due sieri di controllo ripetuti in 30 sedute diverse, è risultata pari a 6,5%.

Discussione e conclusioni. Nel nostro laboratorio alcuni dosaggi non vengono eseguiti giornalmente; secondo la pratica comune, dopo centrifugazione dei campioni, il siero viene trasferito in un'altra provetta e conservato a +4°C fino a una settimana. Per snellire la fase pre-analitica è possibile utilizzare per il prelievo una provetta con gel separatore e mantenere i campioni centrifugati nel tubo primario. Non trovando in letteratura dati relativi a questo tipo di conservazione dei campioni per il dosaggio delle tIgE abbiamo cercato di valutare se i risultati vengano alterati dalla permanenza per più giorni a contatto con gel separatore. I dosaggi eseguiti sui campioni conservati per 7 giorni dimostrano valori leggermente aumentati, con un bias negativo (t0-t7). Maggiore è il bias negativo a 14 giorni. La differenza a 7 giorni è inferiore alla variabilità analitica del test. La variabilità complessiva dei campioni conservati è invece risultata rilevante sia in sovra che in sottostima della concentrazione. Il bias medio diventa superiore alla variabilità analitica nei campioni conservati per 14 giorni. La valutazione del bias medio porta ad affermare che campioni conservati in tubo primario con gel separatore sono stabili per una settimana. In alcuni casi abbiamo notato una differenza tra la concentrazione di tIgE misurata sul campione fresco e quella misurata dopo conservazione che raggiungeva anche il 20% e questo sia in positivo che in negativo. E' difficile attribuire la causa di questo comportamento al solo contatto con il gel separatore, sembra più probabile che vi siano problemi di stabilità delle tIgE comunque conservate. Per questa valutazione è in corso uno studio sulla stabilità di campioni sierati in provetta secondaria.

STABILITÀ DELLE IgE SPECIFICHE IN CAMPIONE CONSERVATO IN TUBO PRIMARIO CON GEL SEPARATORE

B-25

E. Marzot, M. Negri, D. Giavarina, G. Soffiati

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia-Ospedale "S.Bortolo"-Vicenza

Scopo del lavoro. Verificare la stabilità delle IgE specifiche (sIgE) in campioni mantenuti per più giorni in tubo primario con gel separatore dopo centrifugazione.

Materiali e metodi. Sono stati selezionati 10 campioni con livelli di sIgE rilevabili verso 15 allergeni diversi; i campioni sono stati prelevati in provetta con gel separatore (Vacutainer SST TM Gel e attivatore coagulazione - Becton Dickinson), centrifugati e mantenuti nel tubo primario. Le sIgE sono state dosate (sistema UniCAP1000 - Sweden Diagnostics S.r.l., Milano, Italia) il giorno stesso del prelievo, dopo 7 e dopo 14 giorni di permanenza a +4°C.

Risultati. I bias valutati secondo Bland and Altman sono riassunti in tabella

Discussione e conclusioni. Pur con il limite della bassa numerosità dei campioni per allergene, i bias dopo 7 giorni di conservazione in tubo primario denotano solo una lieve tendenza all'aumento di concentrazione e il CI non esclude un bias=0 per alcun allergene tranne f2. Dopo 14 giorni il bias negativo aumenta, in due casi significativamente (*). I campioni possono essere quindi conservati fino a 7 giorni in tubo primario con gel separatore. Le variabilità complessive, talora rilevanti, inducono a nuovi studi per verificare la stabilità dei campioni comunque conservati.

Tabella: bias (intervallo di confidenza al 95%) e limiti di variabilità tra i livelli di IgE specifiche misurate il giorno del prelievo (t0) e dopo 7 (t7) o 14 (t14) giorni. Risultati espressi in kU/L. Numero di campioni per allergene: 10.

	bias (t0-t7g)		limiti di variabilità		bias (t0-t14g)		limiti di variabilità	
		95% CI				95% CI		
f1	-0,1	(-0,2 a 0,0)	-0,4	0,2	-0,2	(-0,4 a 0,0)	-0,7	0,4
f2	-0,2	(-0,3 a -0,1)*	-0,5	0,2	0,4	(-0,9 a 0,1)	-1,7	0,9
f4	0,2	(-0,1 a 0,5)	-0,7	1,1	0,1	(-0,4 a 0,5)	-1,1	1,3
f13	-0,1	(-0,4 a 0,1)	-0,8	0,6	-0,2	(-0,7 a 0,3)	-1,7	1,2
d1	-0,4	(-3,4 a 2,6)	-8,7	7,9	-1,2	(-4,8 a 2,5)	-11,1	8,7
d2	-2,7	(-6,1 a 0,8)	-12,2	6,8	-3,0	(-6,3 a 0,3)	-12,0	6,0
e1	-0,7	(-1,4 a 0,1)	-2,8	1,5	-0,6	(-1,1 a -0,1)*	-1,9	0,8
e5	0,6	(-0,8 a 2,1)	-3,4	4,6	0,0	(-0,3 a 0,3)	-0,7	0,7
g2	-1,0	(-3,4 a 1,4)	-7,5	5,6	-1,9	(-5,8 a 2,0)	-12,6	8,9
g6	0,0	(-1,6 a 1,6)	-4,5	4,5	0,0	(-1,5 a 1,4)	-4,0	3,9
m6	-0,6	(-2,4 a 1,1)	-5,5	4,2	-1,0	(-2,1 a 0,1)	-3,9	2,0
t3	-0,1	(-0,5 a 0,3)	-1,2	1,1	-0,7	(-1,1 a -0,2)*	-2,0	0,7
t4	-0,1	(-0,7 a 0,5)	-1,9	1,7	-0,4	(-1,1 a 0,4)	-2,4	1,6
w6	0,2	(-0,1 a 0,5)	-0,7	1,1	0,1	(-0,2 a 0,4)	-0,7	0,9
w19	0,1	(-0,8 a 0,9)	-2,2	2,3	-0,4	(-2,7 a 1,9)	-6,8	6,0

POLLINOSI DA COMPOSITAE (AMBROSIA ED ASSENZIO) NEL PERIODO ESTIVO NELLA ZONA DEL BASSO LAGO DI GARDA

B-26

Goglion P.C.*, Olivetti I.*, Lelli E.*, Melchiorre A.°, Milanese B.*

* Laboratorio di Patologia Clinica e Dip. Medicina di Laboratorio; ° Divisione di Pneumologia - A.O. di Desenzano del Garda (Brescia)

Scopo del lavoro: si è voluto verificare l'incidenza di alcune specie erbacee responsabili del cosiddetto raffreddore di ferragosto e sostanzialmente riconducibili alle specie di due erbe appartenenti alla famiglia delle Compositae : l'Assenzio e l'Ambrosia.

Materiali e metodi: il periodo di osservazione di queste particelle polliniche aerodisperse è stato di tre mesi (da luglio a settembre) vista la loro specifica periodicità, dal 1998 al 2005. E' stato utilizzato il campionatore volumetrico Hirst VPPS (ditta Lanzoni). Trattasi di una pompa aspirante, posta sulla sommità dello Ospedale, dotata di un rullo regolato da un timer, sul quale viene fissato un film spalmato di un gel siliconato in soluzione di tetra - cloruro di carbonio che serve per fissare i pollini aerodispersi. Nella fase successiva vengono allestiti i preparati che, colorati con fucsina fenicata, permette l'identificazione morfologica. L'Ambrosia è un'erba monoica (ossia esemplari maschili distinti da quelli femminili), con un polline ad elevato potere allergenico, alta fino a 90 cm. ; predilige terreni asciutti, ricchi in nutrienti ed è diffusa soprattutto in Italia nord-orientale (Lombardia, Veneto e Friuli). La capsula di questo polline ha notevoli proprietà antigeniche tali da indurre la produzione di sostanze che caratterizzano la sintomatologia tipica (fotofobia, lacrimazione, edema congiuntivale, salve di starnuti con rinorrea acquosa. L'Assenzio è presente nelle nostre zone in due specie: Assenzio Maggiore (Artemisia Absinthium) ed Assenzio Minore (Artemisia Vulgaris). Presenta un periodo di pollinazione pressochè sovrapponibile a quello della Ambrosia. L'Assenzio è una pianta erbacea fortemente aromatica, provvista all'ascella dell'apparato fogliare di numerosissime ghiandole infossate, che torchiate, producono un'olio essenziale molto amaro e molto velenoso (tuione) ad azione neurotossica ed epilettizzante. Le foglie e le estremità fiorite vengono utilizzate per la preparazione di prodotti fito-terapeutici ed in liquoreria (vermouth). Hanno anche proprietà antipiretiche ed antielmintiche.

Risultati e conclusioni: le più elevate concentrazioni di entrambe queste Compositae si sono riscontrate nella seconda decade di agosto e nella prima decade di settembre, con punte che hanno raggiunto gli 800 granuli/mc d'aria per l'Ambrosia ed i 40-50 granuli/mc per l'Assenzio. La caratteristica fondamentale di queste particelle è la periodicità stagionale che spiega la comparsa del cosiddetto raffreddore di ferragosto. La dose soglia scatenante la sintomatologia viene stimata in circa 20 granuli/mc d'aria.

LA CITOFLUORIMETRIA NELLA DIAGNOSI DELLE REAZIONI DI IPERSENSIBILITÀ AGLI ANTI INFIAMMATORI NON STEROIDEI

B-27

Brusca I., Gristina T., Polizzi G., Barrale M., Cantisano V., Li Vigni P., La Chiusa SM.

U.O. Patologia Clinica , Ospedale "Buccheri la Ferla" F.B.F. Palermo

Introduzione. La diagnosi "in vitro" dell'allergia a farmaci presenta molte difficoltà ed incertezze. Il dosaggio delle IgE specifiche è disponibile e scientificamente validato solo per pochi farmaci ed è comunque gravato da una sensibilità non elevata. Recentemente (1) sono stati proposti metodi che utilizzano, ai fini diagnostici, marcatori di attivazione dei basofili, evidenziabili in citofluorimetria dopo incubazione delle cellule in vitro con il farmaco. Nel nostro studio abbiamo analizzato i risultati del I° anno di utilizzo di questa metodica nella diagnosi delle reazioni di ipersensibilità ai farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS).

Materiali e metodi. Sono stati inclusi nello studio 41 pazienti consecutivi. 21 di questi avevano presentato sindrome orticaria-angioedema (SOA) in seguito all'assunzione di FANS, (gruppo A: diagnosi clinica certa); 11 pazienti avevano presentato SOA in seguito a somministrazioni di FANS e antibiotici betalattamici (BLAT) (gruppo B, attualmente ancora senza diagnosi clinica); 9 avevano anamnesi negativa nei confronti dei FANS ed avevano assunto i farmaci testati (gruppo C, controlli sani). L'attivazione dei basofili è stata valutata in citofluorimetria utilizzando come marker il CD63. Gli allergeni testati sono stati: Metamizolo, Aspirina, Diclofenac, Ibuprofene e Paracetamolo. Reagenti e farmaci sono disponibili in commercio (Flow Cast, Allergen Cast; Bühlmann, Basel, CH). Sono stati considerati positivi gli allergeni con una attivazione dei basofili almeno doppia rispetto al controllo negativo del paziente. Sono state dosate inoltre le IgE specifiche per Aspirina e Piramidone (Unicap, Sweden Diagnostics).

Risultati. 17/21 pazienti del gruppo A hanno presentato almeno uno degli allergeni testati positivo (80,95 %, 95% C.I. 73,26-88,65); nello stesso gruppo le IgE specifiche sono risultate presenti in 1/21 pazienti. Ugualmente negativa è stata la ricerca di IgE specifiche nei gruppi B e C. Nel gruppo C 3/9 pazienti presentavano deboli ma significative reazioni ai FANS: 2 all'aspirina, 1 al metamizolo. La specificità del Flow Cast nei confronti dei farmaci testati è stata quindi del 75% (95% C.I. 66,51-83,49) . Nel gruppo B 2 pazienti sono risultati totalmente negativi; 3 sono risultati positivi ad almeno uno degli allergeni BLAT e negativi ai FANS testati; 6 positivi ad entrambe le classi di farmaci di cui 2 a tutti gli allergeni testati .

Discussione. I risultati ottenuti evidenziano, la sensibilità del metodo e la sua capacità di diagnosticare anche le reazioni pseudo allergiche , ma i dati sulla specificità suggeriscono la necessità di una attenta valutazione clinica.

(1) Ebo et al. Clin Exp Allergy 2004; 34:332-339

IL TEST COMBINATO NELLA DIAGNOSI PRENATALE DELLA SINDROME DI DOWN NELLE PAZIENTI CON PIU' DI 35 ANNI

C-01

Carta M., Fortunato A., *Catapano P., °Montaldi A., *Marchesini M., °Celli P., Soffiati G.

Laboratorio di chimica clinica ed ematologia

*U.O. Ostetricia e Ginecologia, °Sezione di Genetica Umana, Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

Scopo del lavoro: Il test combinato (TC) si basa sulla misurazione della translucenza nucale, sul dosaggio di due parametri biochimici materni, free B-hCG e proteina A plasmatica associata alla gravidanza e sull'età materna. Tale approccio è ormai considerato come di scelta se si opta per uno screening nel 1° trimestre di gravidanza (SURUSS Study). La maggior parte dei ginecologi tuttavia non raccomanda l'utilizzo delle tecniche di screening non invasivo nelle donne con più di 35 anni, preferendo inviare le gestanti direttamente ad indagini invasive (villocentesi (VCS) o amniocentesi (AMC)). In questo lavoro è stata valutata l'efficacia del test anche nelle donne di età materna avanzata.

Materiali e metodi: Sono state inserite nello studio le pazienti che afferivano al nostro ambulatorio per eseguire il TC (dosaggi su Immulite 2000 Euro/DPC, Los Angeles, CA) con età pari o superiore a 35 anni e le pazienti che eseguivano la VCS per la sola indicazione "rischio per età materna".

Risultati: Complessivamente sono state sottoposte a TC 409 pazienti. 4 pazienti sono state escluse dallo studio per aborto spontaneo. Le altre sono state valutate sulla base dei risultati di VCS (140), AMC (30) o nascita del feto (235). Sono risultate positive allo screening 73 pz: tra queste 7 erano i veri positivi (VP) (5 Trisomie 21 (T21), 1 T 13, 1 T 18). Non ci sono stati falsi negativi. La specificità del test è pari a 83,6%.

Discussione e conclusioni: Il TC mantiene una buona efficacia anche nella popolazione over 35. Il valore predittivo positivo (VPP) è di 1:11, poco diverso rispetto a quello da noi ottenuto sulla popolazione generale (1:7). Analizzando i FP suddividendoli in base all'età materna passiamo da 9,6% (IC 6,4-14,3%) nelle donne tra 35-37 anni, a 16,2% (11,4-24,4%) nelle donne tra 37-39 anni, a 26,7% (17,1-39%) in quelle tra 39-41 anni, a 38,4% (17,7-64,5%) nelle donne tra 41 e 42 anni per arrivare infine a 88,8% (66,5-98%) nelle donne > 42 anni. Si può quindi notare che anche se il numero di FP aumenta con l'età materna, il test mantiene il suo significato almeno fino alla soglia dei 42 anni. Infatti dopo questa età il rischio di partenza è tale che lo screening difficilmente può risultare negativo e quindi perde significato, ma anche nella fascia 41-42 anni il test comunque può evitare, ad almeno 1 donna su 2, il ricorso a tecniche invasive con relativo rischio di perdita di feto sano. Tali dati sono sovrapponibili ad uno studio eseguito in maniera similare (Centini S, Prenatal Diagnosis, 2005). Il test mantiene quindi un suo ruolo e un significato anche nelle donne di età materna avanzata.

RUOLO DELLA FOSFOMANNOMUTASI 2 NELLA REGOLAZIONE DEL RIASSORBIMENTO DEL SODIO

C-02

Menniti M., Amato R., Perri A., Iuliano R., Perrotti N.

DMSC, Università Magna Graecia, Catanzaro

Introduzione. La Fosfomannomutasi 2 (PMM2) è l'enzima chiave nella glicosilazione post-traduzionale delle proteine. Mutazioni nel gene codificante per PMM2 sono responsabili di una rara malattia autosomica recessiva, la CDG Ia (Congenital disorder of glycosylation type Ia). Si tratta di una malattia multisistemica che interessa il sistema nervoso centrale, caratterizzata da ritardo psicomotorio, dalla presenza di insufficienti proteine sialilate (transferrina e diverse proteine secretorie). La diagnosi si basa sull'evidenza di anomalie nella glicosilazione delle glicoproteine sieriche, sul dosaggio enzimatico leucocitario e sulla ricerca di mutazioni nei geni corrispondenti. Con il metodo del doppio ibrido in lievito, abbiamo recentemente identificato PMM2 come uno dei partner molecolari di Sgk, una chinasi che svolge una funzione chiave nella regolazione ormonale del riassorbimento tubulare del sodio, da parte di insulina, aldosterone, vasopressina (Menniti M. et al. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2005). Recentemente è stato descritto il caso di una bambina affetta da CDG Ia, con mutazione F119L/F157S, che presentava ipertensione arteriosa resistente alla terapia, edema generalizzato, ricorrenti effusioni pericardiche e pleuriche, trombocitopenia e iperferritinemia congenita persistente, e segni d'attivazione macrofagica nel midollo osseo (Noelle V. et al. Eur. J. Pediatrics 2005). La maggior parte di questi sintomi possono, almeno teoricamente, essere spiegati da un'augmentata attività di Sgk, con conseguente incremento della ritenzione sodica. Con il presente lavoro abbiamo voluto verificare la possibilità che la mutazione di PMM2 comporti un aumento dell'attività chinasi di Sgk.

per PMM2 wild type, mediante mutagenesi sito specifica. Il gene mutato è stato subclonato in un vettore di espressione eucariotico (pCELF-HA). Cellule COS7 sono state trasfettate con vettori eucariotici esprimenti PMM2 wild type e mutata. L'attività chinasi di Sgk è stata misurata, mediante fosforilazione "in-vitro" di un peptide artificiale, negli immunoprecipitati di immunoglobuline dirette contro Sgk.

Risultati e Discussione. La cotrasfezione di cellule COS7 con PMM2 wild type aumenta l'attività chinasi di Sgk, sia in condizioni basali che dopo stimolo di insulina. La presenza della mutazione F157S in PMM2 determina un notevole incremento dell'attività di Sgk, che non risulta essere ulteriormente stimolata da insulina. Il risultato suggerisce un ruolo di PMM2 nella regolazione del riassorbimento del sodio, mediato da Sgk e contribuisce a spiegare la patogenesi di alcuni dei sintomi associati al caso descritto di CDGIA. E' auspicabile l'applicazione alla diagnostica di laboratorio di questo approccio metodologico.

EFFETTI MOLECOLARI DEL PPAR γ E DEI TIAZOLIDINEDIONI (TZD) SULL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE DELL'INSULINA (RI): IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE E CLINICHE

C-03

Costa V., Paonessa F., Gulletta E., Foti D., Brunetti A.

Dip.to di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Catanzaro "Magna Græcia", Catanzaro

Scopo del lavoro: I TZD, una nuova classe di farmaci anti-diabetici, agiscono attivando il fattore nucleare di trascrizione PPAR γ , sensibilizzando i tessuti bersaglio all'azione dell'insulina attraverso meccanismi non del tutto noti. In questo studio abbiamo valutato gli effetti del PPAR γ e dei TZD sul RI, una proteina chiave nella mediazione dell'effetto biologico dell'insulina.

Materiali e Metodi: Gli effetti del PPAR γ sono stati valutati nelle cellule 3T3-L1 ed HepG2 trasfettate con un vettore d'espressione per PPAR γ e stimulate con TZD (rosiglitazone o ciglitazone). Il RI e le proteine nucleari studiate venivano quantificate mediante Western blot. Gli effetti sulla trascrizione genica del RI dopo trasfezione sono stati valutati mediante l'analisi del gene reporter CAT, clonato a valle del promotore del RI. Le interazioni proteina-proteina e proteina-DNA venivano studiate, rispettivamente, con la tecnica del GST-pull-down e mediante EMSA.

Risultati: In presenza di PPAR γ il contenuto di RI si riduceva e tale riduzione era più evidente in presenza dei TZD. La riduzione della proteina recettoriale correlava con la ridotta trascrizione genica del RI, come evidenziato dall'analisi CAT. L'effetto osservato era indipendente dalla presenza di siti consensus putativi per PPAR γ inibenti il promotore del RI e dalla variazione nel contenuto delle proteine nucleari (HMGA1, Sp1, C/EBP β) stimolanti la trascrizione genica del RI. Abbiamo ipotizzato che il meccanismo responsabile di tale riduzione fosse dovuto alla sottrazione, da parte di PPAR γ , di fattori nucleari stimolanti l'espressione genica del RI. I nostri risultati indicano che, in vitro, PPAR γ interagisce fisicamente con Sp1 e C/EBP β ; inoltre, lo studio funzionale eseguito mediante EMSA dimostra che PPAR γ sottrae Sp1 e C/EBP β dai rispettivi siti consensus situati sul promotore del RI.

Discussione e conclusioni: I TZD sono farmaci insulinolo-sensibilizzanti aventi molteplici effetti sul metabolismo, sul tessuto adiposo e sul sistema cardiovascolare. I nostri dati dimostrano che il PPAR γ e i suoi agonisti riducono l'espressione del RI e tale effetto si esplica a livello molecolare attraverso la sottrazione, mediante interazione proteina-proteina, dei fattori nucleari Sp1 e C/EBP β , essenziali per la trascrizione genica del RI. Sebbene questi dati non supportino il ruolo insulinolo-sensibilizzante dei TZD, essi sono in accordo con la complessità degli effetti determinati dagli agonisti del PPAR γ . La riduzione del RI può infatti svolgere un ruolo anti-proliferativo in alcuni tessuti e può costituire un importante meccanismo di autoregolazione nel processo di differenziazione del tessuto adiposo mediato dal PPAR γ .

STUDIO SULLA FATTIBILITÀ DELLO SCREENING PER PARVOVIRUS UMANO B19 CON METODICA PCR IN LIGHT-CYCLER

C-04

di Natale C.^a, Gessoni G.^b, Barin P.^a, Tissi M.P.^a, Arreghini N.^a, De Fusco G.^a, Fezzi M.I.^a, Frigato A.^a, Marchiori G.^a

^aServizio di Immunematologia e Trasfusionale, Azienda ULSS 12 Veneziana, Venezia ^bDipartimento di Patologia Clinica A-USL 14, Chioggia

Scopo del lavoro. Presso il Nostro Servizio è già eseguito lo screening per HBV-DNA, HCV-RNA ed HIV1-RNA per la qualificazione biologica del sangue. Per il frazionamento industriale del plasma è richiesto, in aggiunta, lo screening per HAV-RNA e B19-DNA. Il presente lavoro espone i risultati di uno studio di fattibilità per lo screening per eritrovirus prima dell'invio del plasma al frazionamento industriale.

Materiali e Metodi. Abbiamo utilizzato il kit Light Cycler-Parvovirus B19 quantitativo (Roche Diagnostics GmbH) su strumentazione automatica dedicata. In una fase preliminare abbiamo valutato la sensibilità del test diluendo opportunamente lo standard B19-DNA ISS 0300. E' stata allestita una soluzione contenente 100 UI/mL e da questa delle diluizioni a fattore due, ciascun punto è stato testato in triplicato. Per valutare la robustezza alla cross-contaminazione, un campione ad elevata viremia (circa 140.000 copie/ μ L) è stato testato alternativamente ad un campione negativo. Dopo la messa a punto dell'operatività del test abbiamo proceduto come segue: 2.6 μ L del controllo interno del kit (CI) sono stati aggiunti a ciascun mini-pool (24 unità) prima di procedere all'estrazione degli acidi nucleici. I test NAT per HBV, HCV e HIV erano eseguiti come di norma, l'estratto residuo era congelato a -80°C e scongelato al momento di eseguire il test. In ciascuna seduta analitica erano processati i controlli, gli standard del kit e 25 mini-pool.

Risultati. Il detection limit trovato è stato di 4 UI/mL (13 copie/ μ L). La valutazione della cross-contaminazione è stata eseguita su sei coppie di campioni. Abbiamo testato 75 mini-pool per un totale di 1800 unità. Non abbiamo osservato sedute invalide, solo 3 mini-pool invalidi, mentre un mini-pool è stato trovato ripetutamente reattivo, con viral-load di 1500 UI/mL.

Discussione e conclusioni. L'aggiunta del CI per B19 non interferisce con i test per HBV-DNA, HCV-RNA e HIV1-RNA. Su 1800 unità esaminate, solo una è risultata positiva, con un viral-load molto basso ed inferiore al valore indicato in letteratura come soglia di pericolosità (10.000 UI/mL). Va precisato che il kit, attualmente, è utilizzabile solo per ricerca e non per uso diagnostico. Lo screening per B19-DNA risulta fattibile in una struttura trasfusionale di medie dimensioni, richiedendo un carico di lavoro aggiuntivo di 90 minuti per 25 mini-pool pari a 600 unità.

RICERCA DELLA DELEZIONE DEL BRACCIO LUNGO DEL CROMOSOMA 13 (13q-) NEL MIELOMA MULTIPLO MEDIANTE IBRIDAZIONE IN SITU A FLUORESCENZA (FISH)

C-05

Milanesi B.°, Barbieri P.*, Calarco M.*, Gheda M.*, Lorenzi M.*, Regazzoli A.*

°Dip. Medicina di Laboratorio A.O.Desenzano del Garda, *1°Lab.Analisi A.O.Spedali Civili Brescia

Scopo del lavoro: sono stati analizzati con FISH campioni di sangue midollare provenienti da pazienti affetti da mieloma multiplo (MM) per la ricerca della delezione 13q (13q-). In questi ultimi anni numerosi studi hanno infatti messo in luce che, mentre attraverso lo studio del cariotipo eseguito con le tradizionali tecniche di citogenetica si riesce a mettere in evidenza la presenza di alterazioni cromosomiche solo in meno della metà dei casi di MM, utilizzando invece la FISH, che può essere applicata anche su nuclei in interfase e quindi permette l'analisi anche di cellule che difficilmente si replicano in coltura, come le plasmacellule (PC), è possibile individuare nella quasi totalità dei casi di MM la presenza di numerose anomalie; fra queste la 13q- è risultata essere una tra quelle che correlano con un andamento più aggressivo della malattia.

Materiali e metodi: sono stati esaminati 244 campioni di sangue midollare provenienti da pazienti affetti da MM; per i primi 110 campioni è stato utilizzato il sangue midollare tal quale senza alcun pretrattamento, mentre un secondo gruppo di 134 è stato sottoposto ad un sistema di purificazione (Miltenyi Biotec), che sfrutta la separazione magnetica delle PC dopo incubazione con anticorpo monoclonale anti CD138 legato a microbiglie magnetiche. La sonda utilizzata per l'esecuzione della FISH è reperibile in commercio (LSI 13-RB1 locus, band 13q14, Vysis) e ibridizza in regione 13q14 dove è situato il gene del retinoblastoma.

Risultati: dei 244 campioni totali sono risultati adeguati per l'esecuzione dell'analisi 195 e la delezione 13q è risultata presente in 89 casi (45.6%). L'utilizzo del sistema di purificazione delle PC ha permesso di ridurre in modo considerevole il numero di campioni non analizzabili a causa di una scarsa quantità di PC presenti, passando da 40/110 (36%) nel gruppo senza arricchimento a 9/134 (6.7%) nel gruppo sottoposto ad arricchimento.

Discussione e conclusioni: riuscire a trovare delle specifiche alterazioni cromosomiche, che possano correlare con un andamento più sfavorevole della forma mielomatosa, permette di enucleare i pazienti a più alto rischio da sottoporre a terapie aggressive fin dall'esordio, senza aspettare l'evolvere della malattia; la delezione 13q sembra essere una di queste e nel nostro studio abbiamo osservato che su una popolazione di 195 pazienti affetti da MM essa è presente nel 45.6% dei casi. Abbiamo anche valutato l'efficacia del sistema di purificazione del campione tramite separazione magnetica, che ci ha permesso di ridurre dal 36% al 6.7% il numero dei campioni non analizzabili a causa di una scarsa quantità di PC presenti.

AUTOANTICORPI ANTI RECETTORE DELL'ACETILCOLINA IN PAZIENTI AFFETTI DA PEMFIGO VOLGARE

C-06

Lobreglio G., Torsello R., Basile R., Panzera C., Pensa P.

U.O. Patologia Clinica, Ospedale "Vito Fazzi", AUSL LE/1, LECCE

Scopo del lavoro. Il pemfigo è una malattia autoimmune caratterizzata dalla formazione di bolle sulla cute e sulle mucose, causato da autoanticorpi contro antigeni presenti sulla superficie dei cheratinociti; tali anticorpi sono diretti contro antigeni desmosomiali transmembrana, rappresentati prevalentemente da desmogleina 3 nel pemfigo volgare (PV) e da desmogleina 1 nel pemfigo foliaceo (PF). Tuttavia, analisi sierologiche e sperimentali suggeriscono che nel pemfigo gli autoanticorpi possano reagire anche con altri antigeni presenti sulla superficie dei cheratinociti. Lo scopo di questo studio è di ricercare la presenza di autoanticorpi antirecettore dell'acetilcolina, molecola che contribuisce al controllo dell'adesione e della motilità dei cheratinociti, nei pazienti affetti da malattie bollose cutanee.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 23 pazienti affetti da PV e 2 da PF; come controlli sono stati valutati 6 pazienti affetti da pemfigoide bolloso, 4 da dermatite erpetiforme, 5 da lupus eritematoso sistemico (LES), 10 da orticaria cronica e 10 soggetti normali. Gli anticorpi sono stati ricercati nel siero dei pazienti e dei controlli con immunofluorescenza indiretta su substrati di primate e con metodica immunoenzimatica.

Risultati e conclusioni. Autoanticorpi anti recettore dell'acetilcolina sono stati trovati a vario titolo in 18 pazienti affetti da PV e in nessun controllo ($p < 0.001$); mentre in 14 di questi pazienti erano presenti anche anticorpi anti desmogleina 3, in quattro pazienti erano presenti solo anticorpi anti recettore dell'acetilcolina. Questi risultati suggeriscono che anticorpi antirecettore dell'acetilcolina possono contribuire all'insorgenza dei blister cutanei e mucosi in alcuni pazienti affetti da pemfigo volgare.

Bibliografia. Bystry JC, Rudolph JL. Pemphigus. The Lancet 2005, 366, 61

QUALITÀ TOTALE NELLA ORGANIZZAZIONE DI UN LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA: IL MODELLO DESENZANO DEL GARDA

C-07

Milanesi B., Pedroni M., Tani C., Cocchi G.

Laboratori di Patologia Clinica dell'A.O. di Desenzano del Garda

Scopo del Lavoro. I Laboratori di Patologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera di Desenzano del Garda (P.O. di Desenzano-Lonato, Gavardo-Salò e Leno-Manerbio) hanno cercato di quantificare il miglioramento della "Qualità Totale della Organizzazione di Laboratorio" prendendo in considerazione i seguenti parametri: error rate, controllo del processo, tracciabilità, rintracciabilità, TAT (Turn Around Time), TTFR (Time To First Result), numero di tubi primari, gestione dello stoccaggio, sicurezza degli operatori, rapporto numero di test/FTE (Full Time Equivalent). *Materiali e Metodi.* Sono stati utilizzati i seguenti strumenti operativi: a) implementazione del LIS con l'utilizzo del codice a barre, interfacciamento degli analizzatori, collegamento in rete con punti prelievo e presidi esterni, collegamento con i reparti (accettazione e refertazione), utilizzo dell'ID campione, gestione del check in, tracciabilità e rintracciabilità dei campioni, software di autovalutazione, delta-check in linea, continuous patient reporting. b) consolidamento della fase analitica attuato sia attraverso l'accorpamento in una unica strumentazione degli esami di chimica-clinica, sia attraverso il collegamento con una catena omogenea delle strumentazioni del settore di immunometria (ormoni, markers tumorali, allergologia e sierologia infettiva). c) automazione delle fasi pre e post analitica con il check in, sorting, aliquoting, decapping, storage e retrieval.

Risultati. Miglioramento ottenuto: non esistendo ad oggi parametri oggettivi per la determinazione della qualità organizzativa di un Laboratorio di Patologia Clinica, il progetto è stato valutato utilizzando il "controllo di gestione", che ha confrontato il conto economico, i ricavi ed i costi di produzione, gli indicatori di assorbimento di risorse, gli indicatori qualitativi di efficienza economica. Il reale miglioramento della qualità attuale si riscontra con l'aumento della produzione relativa ai pazienti ambulatoriali, il contenimento dei costi diretti ed il conseguente miglioramento degli utili.

Discussione e Conclusioni. Miglioramento futuro: attuazione di una metodologia valutativa che determini la "Qualità Organizzativa Totale" attraverso l'applicazione della Balanced Scorecard (BSC), i cui principi ispiratori sono la centralità del paziente, l'efficacia, l'appropriatezza e l'efficienza gestionale.

LA PROTEINA C REATTIVA INFLUENZA I LIVELLI DI PAI-1 NEI SOGGETTI DIABETICI PORTATORI DELL'ALLELE 4G IN POSIZIONE -675 DEL GENE PROMOTER DEL PAI-1

C-08

¹Testa R., ¹Bonfigli A.R., ¹Sirolla C., ¹Marra M., ¹Boemi M., ²Mari D., ³Sacchi E., ⁴Dolci A., ⁵Catalano A., ⁵Procio A., ⁶Ceriello A.

¹ Diabetology Unit, INRCA, Ancona, Italy; ² IRCCS Maggiore Hospital, Department of Internal Medicine, Milan, Italy; ³ L. Sacco Hospital, Department of Immunology and Transfusion, Milan, Italy; ⁴ Multimedica Laboratories, Milan, Italy; ⁵ Department of Molecular Pathology and Innovative Therapies, Polytechnic University of Marche, Ancona, and Centre of Cytology, INRCA, Ancona, Italy; ⁶ Department of Pathology and Medicine, Clinical and Experimental, Chair of Internal Medicine, University of Udine, Italy

Scopo del lavoro: Le recenti evidenze scientifiche hanno chiarito che l'infiammazione gioca un ruolo chiave nelle varie fasi del processo arteriosclerotico. E' stato dimostrato che la proteina C reattiva (PCR), oltre ad essere un marker di infiammazione, è anche un fattore capace di per sé di indurre aterosclerosi. Alcuni studi in vitro hanno dimostrato che la PCR influenza l'espressione del PAI-1, suggerendo che questa possa avere anche un ruolo ipofibrinolitico. Poiché è noto che i soggetti diabetici di tipo 2 hanno livelli elevati sia di PCR che di PAI-1, scopo del nostro lavoro è stato quello di studiare, in una popolazione diabetica di tipo 2 senza complicanze, le relazioni esistenti tra PCR e PAI-1 tenendo conto del ruolo del polimorfismo 4G/5G del gene del PAI-1.

Materiali e metodi: Sono stati inclusi nello studio 295 soggetti diabetici di tipo 2 (età media 60.9±10.5 anni) e 290 controlli sani (età media 59.2±11.5). Su questi soggetti sono stati determinati i livelli di PCR (metodo ultrasensibile), di PAI-1 antigene, il polimorfismo 4G/5G ed i principali parametri di controllo glicometabolico.

Risultati: E' stata trovata una significativa correlazione tra i livelli di PAI-1 e PCR nei soggetti diabetici ($r=0.45$ $p<0.001$), mentre nessuna relazione era presente nei soggetti di controllo. L'analisi di regressione multipla ha evidenziato che la PCR è l'unico determinante significativo dei livelli di PAI-1 nei soggetti diabetici (r parziale=0.31 $p<0.01$). Stratificando per genotipo, la regressione multipla ha dimostrato una correlazione positiva tra i livelli di PAI-1 e PCR nei diabetici 4G/4G (r parziale=0.45 $p<0.001$) e 4G/5G (r parziale=0.34 $p=0.007$).

Discussione e conclusioni: Questi risultati dimostrano che la PCR è uno dei principali determinanti dei livelli di PAI-1 nei soggetti diabetici portatori dell'allele 4G. Il nostro lavoro supporta quindi l'ipotesi che la PCR gioca un ruolo di primo piano nella fisiopatogenesi della aterotrombosi diabetica.

RICERCA DI MYCOBACTERIUM TB COMPLEX IN PREPARATI ISTOLOGICI MEDIANTE AMPLIFICAZIONE DI rRNA

C-09

Fabris C.*, Bussani R.°, Schneider M.°, Biasioli B.*

*Dipartimento di Medicina di Laboratorio-Settore di Microbiologia Polmonare-A.O.U. Ospedali Riuniti di Trieste;

°S.C.Anatomia Patologica-A.O.U.Ospedali Riuniti di Trieste

Scopo del lavoro. Nella provincia di Trieste il gruppo a rischio per quanto riguarda la TB è la popolazione anziana e le diagnosi post-mortem di TB dimostrano una prevalenza della malattia superiore a quanto emerge dal semplice flusso di notifiche. Partendo da casi di decesso per TB già diagnosticati sia istologicamente, sia batteriologicamente, abbiamo voluto valutare la performance di Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test (MTD; Gen Probe, San Diego, California) direttamente su sezione istologica.

Materiali e metodi. Sono stati presi in considerazione in tutto 16 prelievi autoptici di polmone con sospetto di lesioni tubercolari o con diagnosi istologica di TB. L'MTD test è stato eseguito su scraping di sezioni di tessuto già colorate con ematossilina-eosina. I risultati sono stati comparati con l'istologia e con gli esami batteriologici (esame microscopico, esame colturale, tipizzazione molecolare dell'eventuale ceppo isolato).

Risultati. Considerando come gold standard il risultato batteriologico, l'MTD test ha mostrato una sensibilità e una specificità del 100%; sensibilità del 92,8% e specificità del 100% comparando i risultati al referto istologico.

Discussione e conclusioni. Gen-Probe Amplified MTD test - in uso ormai da tempo nel nostro settore per la ricerca di Mycobacterium TB complex direttamente da campioni biologici polmonari ed anche extra-polmonari - si è dimostrato sensibile e specifico anche su sezioni istologiche opportunamente trattate. La casistica è limitata ma i risultati finora ottenuti ci spingono a proseguire le indagini per l'utilizzo di MTD direct test come conferma di diagnosi istologiche di TB ed anche:

- per discriminare TB da micobatteriosi
- per distinguere lesioni granulomatose specifiche da quelle non micobatteriche
- nei casi in cui l'unico campione disponibile sia una sezione di tessuto già trattata per l'indagine istologica, quando cioè inizialmente non era stato ipotizzato il sospetto di TB e per tale motivo non era stato preso in considerazione il supporto batteriologico.

IDENTIFICAZIONE DI VARIANTI POLIMORFICHE NEL PROMOTORE DEL GENE 5-LIPOSSIGENASI(5LOX)QUALI INDICATORI DELLA PATOGENESI CARDIOVASCOLARE

C-10

Tavella A.^, Toniato E.^, Ursi S.*, Cipolline F.^, Vitello G.*, Iezzi A.^, Fazia M. ^, Zucchelli M.^, Allegroni A.^, Cuccurullo F.^, Mezzetti A.^, Martinetti S.*^.

* Laboratorio Patologia Clinica II policlinico Universitario "SS. Annunziata" Chieti;

^ Università degli Studi e Fondazione CeSI "G. D'Annunzio" Chieti

Scopo: La 5LOX è un enzima che avvia la pathway biosintetica dei leucotrieni, mediatori biochimici dell'infiammazione cronica. Questa attività è stata individuata per la prima volta nel 1976 da Borgeat che la descrisse come una proteina di 78 kDa. Il gene 5LOX mappa sul Cromosoma 10, ha una lunghezza di 82 kb, ed è composto da 14 esoni separati da 13 introni. La regione fiancheggiante il gene al 5' mostra un'unica sequenza ricca in GC che comprende 5 regioni tandem SP1 di consenso, ma non contiene il box TATA o la sequenza CCAAT. La regione che va da -179 a -56 sembra essere essenziale per l'inizio della trascrizione. Il promotore di 5LOX contiene le sequenze consenso per una varietà di regolatori trascrizionali tra cui Egr, Sp, NF-κB, GATA, myb, e le famiglie AP.

Sono state scoperte alcune varianti polimorfiche del gene caratterizzate da alterazioni nel numero di motivi leganti Sp1 e Egr1 (delezione o addizione di GGGCGG), associate molto probabilmente ad una variazione dell'attività trascrizionale del gene stesso. Data la varietà dei regolatori trascrizionali del promotore di 5-LOX, è ragionevole presumere che il controllo dell'espressione di 5LOX sia complessa e multifattoriale. Si ipotizza che modificazioni nella regione del promotore del gene 5LOX possano indurre una deregulation (up o down) del gene, le cui modificazioni di espressione hanno ripercussioni di rilevanza clinica.

Materiali e metodi. Lo studio è stato condotto tra marzo 2003 ed ottobre 2004. Due i gruppi di pazienti studiati e reclutati nei centri Universitari di Chieti, Pisa, Roma, Palermo. Il primo gruppo composto da 730 pazienti ricoverati, i quali avevano avuto un primo episodio di infarto del miocardio o ictus ischemico. L'altro, composto, a sua volta, da 730 individui ricoverati, che non manifestavano nessuna patologia acuta cardiovascolare o cerebrale. E' stato progettato un kit molecolare con metodologia PCR classica: product size (bp) 172, e successiva analisi di sequenza.

Risultati. La prevalenza cumulativa delle variazioni (addizioni o delezioni) del numero di ripetizioni dei siti di legame Sp1 era più di 4 volte maggiore nei casi rispetto ai controlli (8.4% vs 2.1% P<0.0001). I livelli sierici della PCR erano significativamente più alti nei pazienti portatori delle varianti alleliche (2.88±0.3 vs 0.96±0.2 mg/L P<0.05).

Conclusioni. Questo studio sembra dimostrare che:

1. I polimorfismi del promotore del gene 5-LOX sono associati ad un aumento di rischio di MI indipendentemente dal numero delle repeats
2. La genotipizzazione del gene 5-LOX può dimostrarsi affidabile per la valutazione del rischio genetico cardiovascolare da inserire in una potenziale carta predittiva di analisi di rischio per patologie cardiovascolari.

PREVALENZA DEI DIVERSI GENOTIPI DI HPV DA TAMPONE CERVICALE NEL BACINO DEL GARDA BRESCIANO: DATI PRELIMINARI

C-11

Valentini O., Cresceri S., Milanesi B.

Laboratori di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera di Desenzano del Garda

Scopo del lavoro. Abbiamo raccolto i risultati da noi ottenuti dal febbraio 2005 a tutt'oggi su campioni da tampone cervicale nell'intento di fornire alcune informazioni, ancorché preliminari, sulla prevalenza nel bacino del Garda bresciano dei differenti genotipi di HPV e delle infezioni sostenute da un solo genotipo piuttosto che da più genotipi.

Materiali e Metodi. Le indagini diagnostiche sono state condotte utilizzando il kit commerciale "AlphaStrip HPV" della Alphasgenics Diaco Biotechnologies. Il saggio prevede l'estrazione dell'acido nucleico su colonnina e due amplificazioni genomiche in serie. L'amplificato biotinilato viene poi fatto ibridare su striscia di nitrocellulosa che porta adese 25 sonde genotipospecifiche, oltre a una banda di controllo per coniugato-substrato e a una sonda universale per HPV. La specificità è del 99,9% e la sensibilità è pari a 50 copie/campione. Il saggio consente l'identificazione di 25 genotipi di HPV, ad alto o medio rischio oncogeno (genotipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66) o a basso rischio oncogeno (genotipi 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 61, 69, 70); qualsiasi altro genotipo eventualmente presente viene rilevato, ma non identificato, dalla sonda universale.

Risultati. Dei 300 campioni finora analizzati 86 (28.7%) sono risultati negativi e 214 (71,3) positivi per HPV: di questi ultimi 118 (39.3) per un singolo genotipo e 96 (32.0) per due o più genotipi. Tra i genotipi ad alto o medio rischio si sono osservate le seguenti frequenze percentuali, riportate in ordine decrescente: genotipo 16 (19.0); 31 (12.5); 18 (7.4); 58 (5.6); 52 (5.4); 66 (4.8); 56 (4.5); 33 (3.0); 51 (3.0); 59 (1.8); 39 (1.8); 45 (1.2); 35 (1.2). Tra i genotipi a basso rischio l'ordine di frequenza è risultato il seguente: genotipo 53 (8,9); 6 (4,8); 54 (4,5); 61 (2,7); 70 (2,7); 42 (2,1); 34 (1,8); 40 (1,2); 11 (0,3); 43 (0,3); i genotipi 44 e 69 non sono stati finora osservati. Nelle pazienti con ASCUS la frequenza di negatività è risultata pari al 40.3%, contro un 7.1% per LSIL e un 10.2% per CIN 1,2. In pazienti con ASCUS i genotipi più frequenti sono risultati, nell'ordine: 53, 16, 31, 66, 52, 56, 33; in pazienti con LSIL: 53, 16, 42, 33, 58, 39; in pazienti con CIN 1,2: 16, 31, 53, 52, 18, 58.

Conclusioni. Il paragone con altri dati di prevalenza riportati in letteratura fa emergere una frequenza relativamente più elevata di quanto spesso riportato in passato e in accordo con la letteratura più recente per il genotipo 53, classificato come genotipo a basso rischio; nei casi da noi osservati questo genotipo si riscontra più frequentemente in associazione piuttosto che isolato, con un rapporto 4:1 tra genotipo associato e genotipo singolo. Lo scarso potenziale oncogenico di questo genotipo sembrerebbe trasparire anche in una casistica limitata come la nostra, dove, mentre il rapporto di frequenza CIN/LSIL è maggiore di 1 per i genotipi 16, 31 e 18, lo stesso rapporto è pari a 0.3 per il genotipo 53. Il dato di prevalenza osservato può semplicemente riflettere una peculiare distribuzione locale, che potrebbe essere peraltro transitoria e dovrebbe essere confermato da una casistica numericamente più estesa e più protratta nel tempo.

VALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DI MUTAZIONI ASSOCIATE ALLA FIBROSI CISTICA IN UNA POPOLAZIONE DI NEONATI

C-12

Pirali A., Solinas M., De Francesco D., Fattore D.

AO "Ospedale di Circolo di Busto Arsizio"-P.O. di Busto Arsizio-U.O. Laboratorio Analisi

Scopo del lavoro. Valutare la prevalenza di mutazioni nel gene codificante per Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in neonati con ipertripsinemia.

Materiali e metodi. Lo studio è stato condotto su 932 neonati dei Presidi ospedalieri di Busto Arsizio e Tradate dal 29-3-2005 al 3-9-2005; ai 23 pazienti con elevato valore di tripsinogeno neonatale è stato effettuato, in 24° giornata, un prelievo per lo spot di Guthrie che è stato conservato a -20° fino al momento dell'analisi. L'estrazione del DNA è stata eseguita mediante eluizione su colonnina (QIAamp DNA blood mini kit) secondo un protocollo specifico per gli spots e successiva quantificazione dell'acido nucleico con biofotometro Eppendorf. Per l'amplificazione è stata utilizzata una multiplex PCR (Innogenetics) con hot start TAQ DNA polimerasi su Thermal Cycler PE 9600. La rivelazione è stata effettuata su AUTO LIPA con i kits INNO LIPA CFTR 19 e INNO LIPA CFTR 17+TN update (Innogenetics) che si basano sulla tecnica del reverse dot blot e sono in grado di rilevare 36 delle oltre 1300 mutazioni ad oggi identificate, con detection rate di oltre il 75%.

Risultati. I 23 neonati indagati avevano un peso medio alla nascita di 2978 g +616 e presentavano un valore di tripsinogeno >70 ng/ml (100.75 ng/ml +27.4); il DNA estratto dagli spots di Guthrie aveva una concentrazione media di 12.58 ng/ml+-7.5. Nei 23 campioni esaminati (2.5% del totale dei neonati) non si è ritrovata nessuna mutazione omozigote, mentre sono state riscontrate 2 mutazioni eterozigoti, pari al 9%, di cui 1 ΔF508 e 1 R347P. E' stato valutato anche il polimorfismo dell'introne 8 riscontrando la variante 7T nel 74% dei casi, 9T nel 9%, assetti misti nel 17%, mentre non è stato rilevato nessun caso di variante 5T.

Discussione e conclusioni. I dati sono in linea con la letteratura che evidenzia 2% di neonati con ipertripsinemia, il 10% dei quali presenta una mutazione eterozigote.

TEST GENETICO HLA DI CLASSE II PER LA MALATTIA CELIACA: CONFRONTO FRA METODICHE

C-13

Faricelli R., Rabottini S., Esposito S., Filippi G., Troiano S., Quaranta M., Millevolte C., Ciaramellano A., Di Mascio M., Flacco M., Martinotti S.

U.O. Patologia Clinica - P.O. SS. Annunziata - Chieti

Scopo del lavoro. E' noto che la celiachia si associa alla presenza di specifici alleli del sistema HLA: DQ2 e DQ8. L'eterodimero DQ2 (DQA1*0501/DQB1*0201) (DQA1*0201/DQB1*0202) si esprime nel 90% dei celiaci e nel 20-30% della popolazione sana mentre il DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) nel 5%. Meno del 2% dei pazienti celiaci non esprime né DQ2 né DQ8. Lo scopo del lavoro è stato, oltre a quello di valutare l'utilità della determinazione dell'aplotipo HLA di predisposizione alla celiachia su nuclei familiari e su singoli pazienti, anche quello di valutare i due nuovi test Amplimedical ed Eurospital.

Materiali e metodi. Sono stati esaminati 34 pazienti afferenti da: Patologia Medica, Clinica Pediatrica, Esterni, tutti con patologia conclamata, sospetta o familiarità per Malattia Celiaca. Il protocollo d'indagine includeva, dopo estrazione da sangue periferico, purificazione del DNA ed amplificazione in PCR, due diverse tecniche di rilevazione: ibridazione su strip di nitrocellulosa (Amplimedical) e rivelazione degli amplificati su gel d'agarosio (Eurospital). La differenza sostanziale tra i due test consiste prevalentemente nel tipo di alleli utilizzati: Amplimedical DQ2 (HLA-DQA1*0501 e HLA-DQB1*0201) e (HLA-DRB1*04) Eurospital DQ2 (HLA-DQA1*0501 e HLA DQA1*0201/DQB1*02) DQ8 (HLA-DQB1*0302)

Discussione e conclusioni. L'esame genetico svolto sui nuclei familiari proponeva di individuare i soggetti con predisposizione genetica. In 4 famiglie i 2 test si sono rivelati perfettamente sovrapponibili poiché in presenza di soggetti negativi o positivi per DQ2 aplotipo A1*05/B1*02. In 1 nucleo familiare il test Amplimedical non è riuscito a rilevare in un figlio la positività per DQ2 in quanto gli alleli utilizzati non includevano il DQA1*0201, mentre nella madre ha rilevato solo 2 alleli su 3.. Nell'ultima famiglia il test Amplimedical non ha rilevato la presenza di un DQ8... I singoli pazienti sono stati sottoposti al test poiché vi era la presenza di quadri istologici della mucosa intestinale poco chiari... 4 soggetti che presentavano DQ2 con aplotipo A1*05/B1*02 sono stati rilevati da entrambi i test. In 5 pazienti con aplotipo A1*05/B1*02-A1*0201 il test Amplimedical ha rilevato 2 alleli su 3. 1 soggetto con aplotipo B1*02/A1*0201 è stato ritenuto dal test Amplimedical negativo, pur in presenza di DQ2. Ad 1 paziente con DQ2/DQ8 (aplotipo A1*05-B1*0302/B1*02) il test Amplimedical ha rilevato solo il DQ2 e 2 pazienti con DQ8 (B1*0302) sono stati ritenuti, sempre dallo stesso test, negativi. La scelta degli alleli fatta da Eurospital è più idonea ed è consigliata in presenza di lesioni mucosali borderline, positività anticorpale in assenza di atrofia, pazienti con familiarità come da linee guida della SIMEL.

RUOLO DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE AP2 NELL'IPERESPRESSIONE DEL RECETTORE DELL'INSULINA (RI) NEL CANCRO DELLA MAMMELLA

C-14

Paonessa E., Costa V., Gulletta E., Foti D., Brunetti A.

Dip.to di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Catanzaro "Magna Græcia", Catanzaro

Scopo del lavoro: Numerosi studi eseguiti sia in vitro che in vivo indicano che il contenuto del RI è significativamente aumentato nel cancro della mammella. Il ruolo oncogenico del RI a livello del tessuto mammario è stato attribuito all'induzione di anomalie del metabolismo cellulare nonché all'alterazione dei normali processi di crescita e differenziazione. Tuttavia, a fronte dei numerosi studi sul ruolo funzionale del RI nel cancro della mammella, i meccanismi biochimici e molecolari responsabili della sua iperespressione nel tessuto mammario tumorale non sono ancora stati determinati. Pertanto, lo scopo del nostro lavoro è quello di chiarire tali meccanismi, con particolare attenzione al ruolo che la proteina nucleare AP2, fattore importante nello sviluppo dei tessuti epiteliali, svolge in tale processo.

Materiali e metodi: Sono state utilizzate varie linee cellulari di carcinoma mammario, nonché campioni di tessuto mammario umano neoplastico e normale. Il RI e le proteine nucleari esaminate sono state quantificate mediante Western blot. Le interazioni proteina-proteina e proteina-DNA sono state studiate con la tecnica del GST pull-down, in combinazione con immunoprecipitazione e immunoblot, e mediante EMSA. Il ruolo di AP2 e degli altri fattori di trascrizione è stato valutato in studi di trasfezione mediante l'analisi del gene reporter CAT e con la tecnica della trascrizione in vitro.

Risultati: Sia nelle linee cellulari trasformate che nei campioni di tessuti tumorali umani esaminati è stata riscontrata una chiara correlazione tra l'iperespressione del RI e l'aumento di AP2. L'espressione forzata di AP2 nelle cellule HepG2 (prive di tale fattore) era seguita da un aumento dose-dipendente dei livelli di espressione genica del RI. Compatibilmente con l'assenza di specifici siti consensus per AP2 sul gene del RI, l'attivazione trascrizionale di questo gene da parte di AP2 si realizzava attraverso l'interazione fisica con le proteine nucleari HMGA1 ed Sp1 capaci di legarsi al promotore del RI, inducendone la trascrizione.

Discussione e conclusioni: Il nostro studio dimostra che AP2 stimola la trascrizione genica del RI nei modelli cellulari utilizzati e che esiste una significativa correlazione tra il contenuto del RI e l'espressione di AP2 nel cancro della mammella. In assenza di siti di legame specifici per AP2 sul promotore del RI, la transattivazione di questo gene da parte di AP2 avviene indirettamente, attraverso l'interazione fisica di AP2 con HMGA1 e Sp1. Questi dati indicano che AP2 è coinvolto nei meccanismi molecolari responsabili dell'iperespressione del RI nel cancro della mammella e rafforzano il suo ruolo potenziale come marker della carcinogenesi mammaria.

TRE ANNI DI ESPERIENZA NELLA RICERCA DI MACRO-PROLATTINA CON ANALIZZATORE ADVIA CENTAUR

C-15

Dorizzi RM., Caruso B., Meneghelli S., Rocca M., Filippini M., Rizzotti P.

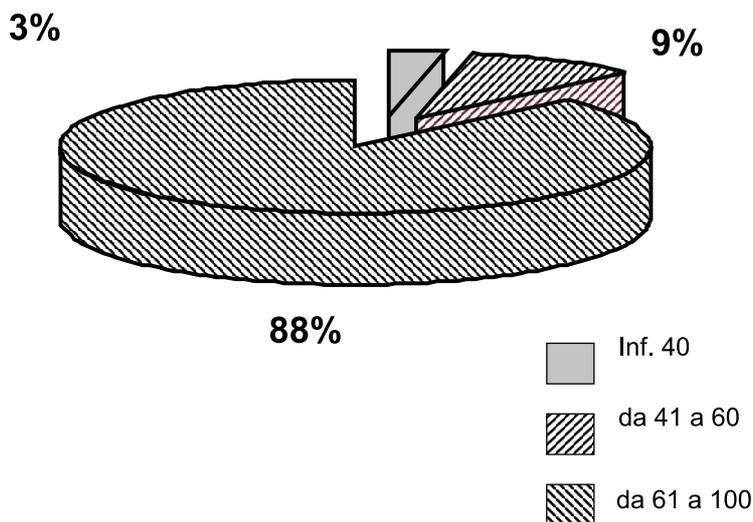
Laboratorio Analisi, OCM, Azienda Ospedaliera di Verona

Scopo del Lavoro. L'interferenza della macroprolattina sulla determinazione di prolattina con metodi manuali ed automatici continua ad essere un argomento molto dibattuto. Lo scopo del lavoro è stato quello di misurare l'effetto della macroprolattina sulla determinazione della prolattina con il sistema Advia Centaur.

Materiali e Metodi. Nel periodo 2003-2005 tutti i campioni con valori di PRL superiori a limite superiore di riferimento in cui veniva richiesto dal clinico veniva sottoposti a trattamento con PEG 6000. 500 mL di siero sono addizionati a 500 ml di una soluzione di PEG 6000; la miscela è vortexata per 1 minuto, centrifugata a 5000 rpm per 6 minuti ed analizzata. La determinazione è stata sempre eseguita con analizzatore Advia Centaur (Milano, Italia).

Risultati. La figura mostra i pazienti che presentano una concentrazione di prolattina dopo il trattamento 1) < 40% (test positivo); 2) compresa tra il 40 ed il 60% (ara grigia) e 3) superiore al 60% test negativo).

Discussione e conclusioni. I nostri risultati confermano quanto riportato da Fahie-Wilson et al (Ann Clin Biochem 2005): il metodo Advia Centaur appare molto robusto nei confronti dell'interferenza da macroprolattina e non appare richiedere lo screening di tutti i campioni "patologici".



TEST RIFLESSI NELLA DIAGNOSTICA ALLERGOLOGICA IN VITRO: QUALITÀ E COSTI

C-16

Ferrari A., Melloni N., Caruso B., Dorizzi R.M., Rizzotti P.

Laboratorio Analisi Chim Clin, OCM, AO, Verona

Scopo del lavoro. I test riflessi, basati su limiti clinicamente significativi, impiegati da molto (es TSH, PSA), sono stati implementati nella determinazione delle IgE specifiche. Dopo l'introduzione di test riflessi per latte, Phadiatop infant, lattice e tropomiosina (ImmunoCap 250, Pharmacia) sono stati valutati i costi del primo semestre del 2005.

Materiali e Metodi. La diagnostica allergologica in vitro si basava su pannelli di allergeni verso cui ricercare le IgE specifiche. Gli allergeni erano stati selezionati sulla base della frequenza di positività per età e per gravità di patologia. Oggi nel caso di IgE per latte > 0,35 KU/L si procede all'esecuzione delle singole proteine, nel caso di Phadiatop infant positivo viene analizzato il pannello per alimenti inalanti per età < 5 anni.

Risultati. Queste regole hanno comportato un risparmio di circa 2000 euro (vedi Tabella).

Discussione e Conclusioni. L'introduzione dei test riflessi in allergologia non solo ha portato un risparmio (che ha permesso di implementare test riflessi per alimenti crossreatanti al lattice e per tropomiosina, allergene comune tra acari e crostacei) ma anche di approfondire le diagnostiche dei fenomeni di crossreazione presenti in vitro, che possono trovare un riscontro nella sintomatologia allergica.

TABELLA. Risparmio determinato dal test riflesso sul latte					
f2 latte	Totali	Negativi	Positivi	% positivi	CAP f76-f77-f78 risparmiati
Maschi >18 anni	123	118	5	4.1%	-15
Femmine > 18 anni	221	213	8	3.6%	-24
Maschi 12-18 anni	23	22	1	4.3%	-3
Femmine 12-18 anni	21	20	1	4.8%	-3
Maschi 6-12 anni	34	27	7	20.6%	81
Femmine 6-12 anni	46	40	6	13.0%	120
Maschi 3-5 anni	36	22	14	38.9%	66
Femmine 3-5 anni	22	15	7	31.8%	45
Maschi 0-3 anni	20	16	4	20.0%	48
Femmine 0-3 anni	13	5	8	61.5%	15
Totale CAP risparmiati					330
RISPARMIO TOTALE= 852 €					
RISPARMIO COMPLESSIVO PHADIATOP INFANT= 1984 €					

FATTORE DI CRESCITA DELL'ENDOTELIO VASCOLARE (VEGF) IN PAZIENTI MASTECTOMIZZATE PER CARCINOMA DELLA MAMMELLA

D-01

Metelli M.R., Fulceri F., Manzone F., Puccetti C., Ferrari P., Panicucci E., Pietrini P.

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

Scopo del lavoro. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) è un mitogeno specifico per le cellule endoteliali la cui isoforma prevalente è il VEGF165; tale proteina promuove l'angiogenesi in condizioni fisiologiche e patologiche, legandosi a specifici recettori endoteliali. Scopo di questo studio è stato quello di valutare se tale attività angiogenetica può essere determinata misurando i livelli circolanti di un singolo fattore angiogenetico quale il VEGF, in pazienti mastectomizzate per carcinoma della mammella, nel follow-up post-operatorio.

Materiali e metodi. Lo studio è stato condotto su campioni di sangue ottenuti da 54 pazienti di età compresa tra 31 ed 83 anni (59 ± 11 , media \pm SD), operate per carcinoma della mammella. Trentatré pazienti erano libere da malattia e ventuno presentavano metastasi in sedi diverse, in trattamento terapeutico con risposta parziale o completa. Per tutte le pazienti i prelievi di sangue sono stati eseguiti in tempi diversi per 18 mesi. I campioni biologici sono stati conservati, dopo opportuna separazione, a -20°C , sino al momento del dosaggio ed i livelli di VEGF-A sono stati testati con metodica ELISA (Bender MedSystems, Austria).

Risultati. La valutazione del comportamento della molecola tra i due gruppi in studio non ha evidenziato delle differenze statisticamente significative; i risultati qui di seguito descritti riportano rispettivamente i livelli mediani riscontrati nelle pazienti libere da malattia e nelle pazienti metastatiche (4.57 vs 0.90 pg/ml, test di Wilcoxon per campioni indipendenti = 0.857 , $p = 0.391$); è stata valutata la possibilità di eventuale differenze tra i pazienti metastatici in base al tipo di metastasi, per questo sono stati suddivisi i dati riscontrati nelle metastasi ossee da quelli riscontrati nelle metastasi multiple (2.0 vs 3.08 pg/ml, test di Wilcoxon per campioni indipendenti = 0.551 , $p = 0.581$); anche questi dati non hanno presentato una differenza statisticamente significativa.

Discussione e conclusioni. In conclusione, in base ai risultati di questo studio, la determinazione del VEGF circolante nel carcinoma mammario sembra avere un ruolo non rilevante e inferiore a quello di altri fattori prognostici di uso comune. Ciò è in accordo con i dati della letteratura e sembra riconducibile al fatto che l'angiogenesi è un processo estremamente complesso cui concorrono molti altri fattori oltre al VEGF. Per questo motivo è necessario continuare lo studio con la valutazione del comportamento del VEGF insieme ad altre molecole che regolano la genesi vascolare, possibilmente nelle fasi precoci di metastatizzazione.

SPECIFICITÀ DELLA CROMOGRANINA A (CgA) NELLA VALUTAZIONE CON OCTREOSCAN PER LA PRESENZA DI TUMORI NEURO-ENDOCRINI

D-02

Ferraro S.¹, Vendramin C.¹, Ciardi L.¹, Cavenaghi G.², Inglese E.², Bellomo G.¹

Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche¹ e Medicina Nucleare², AO Maggiore della Carità, Università del Piemonte Orientale, Novara.

Scopo del lavoro: Il presente studio indaga i livelli elevati di Cromogranina A (CgA), che hanno innescato valutazioni strumentali, per sospetta neoplasia neuroendocrina, quali Octreoscan (SSR-scintigrafia dei recettori della somatostatina), con esito negativo, in rapporto al quadro clinico dei pazienti e ai possibili interferenti endogeni/esogeni.

Materiali e Metodi: L'indagine ha reclutato 60 pazienti sottoposti a dosaggio di CgA ed SSR. Il test CGA-RIACT (SCHERING) identifica CgA intatta e frammenti. Il test Octreoscan prevede acquisizioni a 4 e 20 ore dalla somministrazione di Indio-111 Octeotide (TYCO HEALTHCARE) ad affinità recettoriale per la somatostatina con tecnica total body e tomografica.

Risultati: Con limite di normalità 100ng/ml, in 40 casi CgA risulta positivo (CgA+), di questi solo 14 risultano anche positivi ad SSR (SSR+), mentre 26 risultano CgA+ ed SSR-. L'indagine, in base ai dati clinici dei casi di CgA+ ed SSR-, ha fatto sospettare che l'aumento dei livelli della molecola intatta e dei relativi frammenti, potesse essere associato a patologie interferenti (insufficienza renale, diabete, ipertensione arteriosa, neuropatie) o agli effetti pro-secretori di molecole di origine endogena (gastrina) ed esogena (farmaci). Nella casistica in esame, si sono documentati fattori interferenti come compromissione renale di vario grado (4 casi, CgA=1256 \pm 584ng/ml), diabete mellito di tipo II (2 casi, CgA=622 \pm 534ng/ml), morbo di Parkinson (1 caso, CgA=232ng/ml), ricorrenti crisi ipertensive (1 caso, CgA=269ng/ml), compromissione epatica (1 caso, CgA=252ng/ml), livelli di gastrina elevati (3 casi, CgA=2158 \pm 1768ng/ml) e trattamento con inibitori di pompa protonica (2 casi, CgA=711 \pm 454ng/ml). Eliminando dai 40 casi di CgA+ i 14 documentati con fattori interferenti si ottengono 26 casi di CgA+ di cui 13 anche SSR+. Dal gruppo dei 14 CgA+SSR+, l'unico caso escluso presenta una captazione positiva a livello del surrene ed insufficienza renale. Nel gruppo CgA+SSR+ l'incidenza del fattore interferente è risultata pari al 10%, mentre nel gruppo CgA+SSR- è stata del 50%. Con la correzione per le interferenze riscontrate, il valore predittivo positivo del marcatore come indicazione alla successiva indagine con SSR è migliorato passando dal 35 al 50%.

Discussione e Conclusioni: Le indagini strumentali, quali Octreoscan, per conferma di sospetta neoplasia neuroendocrina, su indicazione di un livello elevato di CgA, dovrebbero essere eseguite solo successivamente all'esclusione di interferenti endogeni, esogeni, e particolari condizioni fisiopatologiche, connesse all'aumento aspecifico dei livelli della molecola intatta e/o dei frammenti derivati.

VALORE PROGNOSTICO DI CROMOGRANINA A(CgA) NEL MONITORAGGIO DELL'ADENOCARCINOMA PROSTATICO

D-03

Ferraro S.¹, Vendramin C.¹, Piazza S.², Tomassini G.¹, Bellomo G.¹

Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche¹ e Oncologia Medica², AO Maggiore della Carità, Università del Piemonte Orientale, Novara

Scopo del lavoro: Questo studio preliminare si propone di valutare il valore prognostico dei livelli di CgA nel monitoraggio di pazienti affetti da adenocarcinoma prostatico in stadio metastatico.

Materiali e Metodi: L'indagine ha reclutato 9 casi di adenocarcinoma prostatico che hanno effettuato il dosaggio per 3 anni (1 caso, 15 dosaggi), 2 anni (3 casi, con media di 12 dosaggi) ed 1 anno (5 casi, con media di 9 dosaggi). Di questi, 8 casi erano in iniziale terapia ormonale e 1 caso in terapia con solo difosfonato. Il dosaggio CgA è stato effettuato con test CGARIACT(SCHERING) che identifica CgA intatta e frammenti, il dosaggio PSA totale(tPSA) con test Third Generation PSA-DPC.

Risultati: In 8 casi la correlazione tra livelli di CgA e tPSA, ripetuti con cadenza mensile in corso di trattamento, è risultata non significativa e in un solo caso ai limiti della significatività ($p=0.04$; $r=-0.5$). In 3 casi l'aumento significativo di CgA è stato associato a compromissione renale (2/3 casi post-chemioterapia) valutata con dosaggio di creatinina (caso 1= 3.37 ± 0.47 mg/dl, caso 2= 2.6 ± 0.36 mg/dl, caso 3= 3.66 ± 1.51 mg/dl). In tutti i 9 casi la stabilizzazione di malattia(SD), relativa al successo terapeutico, è associata a livelli di CgA inferiori al limite di normalità(100ng/ml) e costantemente sovrapponibili, nell'arco temporale in cui il marcatore è stato misurato; si sono valutati 1 caso con CgA= 57.4 ± 9 ng/ml(SD 6 mesi, trattato con ormonoterapia), 1 caso con CgA= 75.1 ± 11.7 ng/ml(SD 13 mesi, trattato con ormonoterapia), 1 caso con CgA= 69 ± 9.6 ng/ml(SD 2 mesi, trattato con ormonoterapia e chemioterapia), 1 caso con CgA= 39.4 ± 4.5 ng/ml(SD 4 mesi, trattato con ormonoterapia e difosfonato), 1 caso con CgA= 91.57 ± 7.23 ng/ml(SD 13 mesi, trattato con difosfonato). In 5 casi un aumento significativo di CgA (da un minimo di 24 ad un massimo di 340ng/ml) anticipa in media di 3 mesi l'evidenza clinica di progressione di malattia(PD). Questo ha indotto un cambiamento di strategia terapeutica. In 2 casi un aumento significativo e repentino del marcatore(24ng/ml/1 mese; 340ng/ml/3 mesi) ha fatto sospettare un'espansione della componente neuroendocrina con associazione di terapia mirata.

Discussione e Conclusioni: La valutazione sistematica delle variazioni di CgA nel monitoraggio dell'adenocarcinoma prostatico ha dimostrato un elevato valore prognostico, inducendo un cambiamento tempestivo della strategia terapeutica ed anticipando la progressione della patologia rispetto all'evidenza clinica. In questo studio il marcatore ha dimostrato un'elevata accuratezza in fase di monitoraggio, sebbene il suo significato prognostico si sia dimostrato differente rispetto a tPSA e meriti ulteriori indagini.

COINVOLGIMENTO CARDIACO IN INTERVENTI DI CHIRURGIA ORTOPEDICA

D-04

Montagnana M.¹, Lippi G.¹, Regis D.², Viola G.², Guidi G.C.¹

¹Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Università degli Studi di Verona; ²Unità Operativa di Ortopedia e Traumatologia, Azienda Ospedaliera di Verona

Scopo del lavoro. Complicanze cardiovascolari sono frequenti dopo interventi chirurgici. Il riconoscimento precoce di compromissione cardiaca è essenziale per stratificare il rischio e la gestione clinica.

Materiali e Metodi. Per valutare il coinvolgimento cardiaco è stata analizzata la concentrazione di troponina T (cTnT), creatina chinasi isoenzima MB (CK-MB), mioglobina, albumina modificata dall'ischemia (IMA) e propeptide natriuretico beta (NT-proBNP) in 37 pazienti sottoposti a chirurgia ortopedica maggiore (10 protesi d'anca, 13 protesi di ginocchio, 14 stabilizzazione di colonna) prima, 4 e 72h dopo l'intervento.

Risultati. I risultati sono riportati in tabella (media \pm DS). La percentuale di pazienti con valori diagnostici dei marcatori è maggiore rispetto al prelievo di base per cTnT (8% vs 3% 4h, 11% vs 3% 72h; $p<0.001$), NT-proBNP (16% vs 14% 4h, $p=0.429$; 70% vs 14% 72h; $p<0.001$) e IMA (86% vs 65% 4h; 89% vs 65% 72h; $p<0.001$).

Conclusioni. L'aumento della percentuale di pazienti con concentrazioni diagnostiche di cTnT e IMA indica un coinvolgimento cardiaco di possibile natura ischemica. L'aumento di NT-proBNP in tutti i pazienti a 72h indica compromissione della funzione cardiaca.

	Prelievo di base	4h post-intervento	72h post-intervento
cTnT (ng/ml)	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.03
CK-MB (ng/ml)	1.8 \pm 0.6	5.5 \pm 4.8 \ddagger	2.4 \pm 1.7 \ddagger
Mioglobina (ng/ml)	38 \pm 13	327 \pm 285 \ddagger	97 \pm 134 \ddagger
NT-proBNP (pmol/l)	9.4 \pm 9.1	11.8 \pm 12.2	29.7 \pm 24.6 \ddagger
IMA (Kunits/l)	106 \pm 32	122 \pm 27 \ddagger	127 \pm 30 \ddagger

Variazione dei marcatori di sofferenza miocardica a seguito d'interventi di chirurgia ortopedica maggiore

($\ddagger p < 0.05$ rispetto al prelievo di base;

$\ddagger p < 0.01$ rispetto al prelievo di base)

VALUTAZIONE DEI LIVELLI SIERICI DI COMP, ANTI-CCP E FATTORE REUMATOIDE IgA/IgM, QUALI POSSIBILI INDICATORI DI PREDITTIVITÀ DI RISPOSTA ALLA TERAPIA CON ADALIMUMAB NELL'ARTRITE REUMATOIDE

D-05

Morozzi G., Cucini S., Bacarelli MR., Pucci G., Simpatico A., Martelli I., Galeazzi M.

Dip. Med. Clin. Sci. Immunol Appl, UOC Reumatologia, AOU senese

Scopo del Lavoro: Valutare in pazienti affetti da artrite reumatoide l'effetto del trattamento con adalimumab sui livelli di COMP, degli anticorpi anti-CCP e del fattore reumatoide di classe IgA e IgM e correlare i valori di questi test con la risposta clinica al trattamento. *Materiali e Metodi:* sono stati reclutati 35 pazienti affetti da artrite reumatoide (AR), consecutivi, che soddisfacevano ai criteri classificativi dell'American College of Rheumatology e sono stati sottoposti a terapia con adalimumab per 52 settimane. 6 pazienti hanno interrotto il trattamento per effetti indesiderati dopo 3 mesi. La valutazione clinica del paziente, la routine e i dosaggi in ELISA di COMP (AnaMar Medical, Sweden), di anti-CCP (Axis-Shield, UK) e dei FR IgA/IgM (Orgentec Diagnostika, Germany) sono stati effettuati basalmente e dopo 3, 6, 12 mesi di terapia. La risposta alla terapia è stata valutata per mezzo dei criteri ACR 20, 50, 70 e tramite lo score DAS28.

Risultati: La percentuale di positività per anti-CCP, COMP e FR IgA/IgM non cambiava durante il trattamento. I pazienti con livelli di COMP <10U/L al basale e dopo 3 e 6 mesi di trattamento mostravano un decremento significativo dello score DAS 28 ed erano più responsivi alla terapia, in accordo ai criteri ACR70, rispetto pazienti COMP positivi al basale ($p < 0,05$). Durante il follow-up non sono emerse correlazioni significative fra i livelli sierici di COMP e PCR e/o VES. Ugualmente nessuna correlazione emergeva fra i livelli di anti-CCP, FR IgG/IgA e i criteri di risposta ACR 20, 50, 70 e DAS 28. La contemporanea positività al basale di COMP e VES/PCR correlava significativamente con la bassa risposta al trattamento in accordo ai criteri ACR70.

Discussione e Conclusioni: nel nostro studio abbiamo voluto verificare se variabili biologiche, quali gli anti-CCP, i FR IgA/IgM e la COMP potessero avere un ruolo come marcatori di prognosi rispetto alla risposta alla terapia in pazienti trattati con adalimumab. Possiamo ipotizzare che il test per il dosaggio della COMP possa essere utilizzato come indicatore predittivo della risposta al trattamento con anti-TNFalfa nell'AR. Infatti, nel nostro studio, la risposta clinica era significativamente maggiore nei pazienti che basalmente erano COMP negativi rispetto a quelli positivi. I nostri risultati confermano inoltre che la positività degli anticorpi anti-CCP e dei FR IgA/IgM non aggiungono nessuna informazione predittiva, come già dimostrato da altri autori in pazienti affetti da AR e sottoposti a terapia con infliximab.

VALUTAZIONE DI sCD40L QUALE MARCATORE PROGNOSTICO NELLA SINDROME CORONARICA ACUTA (SCA)

D-06

Morandini M., Cappelletti P., Bulina P., Rubin D., Cassin M.*, Nicolosi GL.*

Laboratorio di Patologia Clinica, *Cardiologia, AOSMA, Pordenone

Premessa: la strategia per la stratificazione nel rischio in pazienti con SCA prevede il dosaggio di diversi marcatori biochimici, molti ancora in fase di studio. sCD40L (ligando solubile del CD40) è un indice di infiammazione e attivazione piastrinica, ma anche di attività protrombotica nei vari stadi della SCA, per il quale è stato suggerito un valore prognostico.

Scopo del lavoro: valutazione della performance analitica del sCD40L e della sua capacità prognostica in pazienti con SCA. *Materiali e Metodi:* di 161 pazienti con SCA (118 pazienti NSTEMI e 43 STEMI) sono stati raccolti i fattori di rischio, FEVS, marcatori biochimici (cTnI, mioglobina, BNP, hs-PCR, creatinina e sCD40L), e, a 30 giorni dalla dimissione, gli eventi morte, scompenso, angina e reinfarto. La determinazione di sCD40L, su plasma citratato, è stata eseguita col kit sCD40L high-sensitivity (Bender MedSystem®) su ALISEI QS Radim®, analizzatore automatico per metodi ELISA su micropietra. Nell'analisi dei risultati si è valutato l'andamento delle diverse variabili rispetto alla concentrazione di sCD40L, suddividendo la popolazione in quartili e applicando il test χ^2 per le variabili qualitative e ANOVA a una via per variabili continue. Con il test di Mann Whitney si è studiata la possibilità che sCD40L, BNP, cTnI e mioglobina, possano contribuire a distinguere i pazienti NSTEMI da quelli STEMI. Per l'analisi del potere predittivo degli eventi a 30gg, sono stati studiati gli eventi morte e scompenso, utilizzando un'analisi multivariata.

Risultati: il metodo, applicato allo strumento automatico, ha presentato buona imprecisione intraassay CV 3,8%; imprecisione interassay CV 9,9%, per instabilità del sCD40L conservato in frigorifero e dosato dopo 24 ore; linearità 0,08-5,0 ng/mL verso risultati attesi 0,14-2,94 ng/mL. L'automazione favorisce la standardizzazione dei tempi delle varie fasi del processo. Solo cTnI è significativamente differente tra STEMI e NSTEMI. Dall'analisi univariata non sono emerse tendenze significative per fattori clinici e demografici, eccetto che per sesso. Dall'analisi multivariata non appare una tendenza verso una maggiore incidenza di morte e infarto per gli eventi a 30gg nei quartili III e IV di sCD40L, mentre è significativa l'associazione cTnI e morte e BNP e scompenso.

Conclusioni. Per la stratificazione del rischio in pazienti con SCA, l'analisi dei nostri dati conferma che cTnI è il marcatore significativo per mortalità e BNP per scompenso cardiaco, ma non conferma sCD40L come predittore indipendente di eventi maggiori a 30gg. e, quindi, lascia aperta la questione se sCD40L possa essere inserito nella strategia multimarker per la prognosi dei pazienti con SCA.

AUDIT SULLA APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA DI TROPONINA NEL DIPARTIMENTO DI EMERGENZA (DE)

D-07

Rubin D., Cappelletti P., Moscariello F. *, Pontoni E. *

Laboratorio di Patologia Clinica Dipartimento di Medicina di Laboratorio e *SOC Pronto Soccorso e Medicina d'Urgenza, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli" Pordenone

Le Linee Guida Internazionali suggeriscono la messa a punto di un protocollo per la valutazione dei pazienti con sospetta Sindrome Coronaria Acuta (SCA) condiviso tra medici di Laboratorio, Pronto Soccorso e Cardiologia. Nella nostra Azienda, secondo il protocollo operativo deciso dal gruppo di studio multidisciplinare relativo alla diagnosi e gestione dei pazienti con dolore toracico acuto, per la valutazione dei pazienti con bassa o intermedia probabilità di SCA sono richiesti, insieme all'esecuzione dell'ECG, almeno due determinazioni di Troponina I (TnI) entro le 12 ore dal ricovero. Scopo del lavoro è valutare l'appropriatezza delle richieste da parte del Dipartimento di Emergenza. (DE)

Materiali e Metodi. Sono stati valutati, retrospettivamente, i dati dei pazienti afferenti al DE nel periodo compreso tra il 01.01.2005 al 31.06.2005 per i quali è stato richiesto il dosaggio della TnI.

Risultati. Durante il periodo di sei mesi la TnI è stata richiesta per 1609 pazienti. In 433 pazienti è stato seguito il protocollo proposto; 432 pazienti sono stati ricoverati in vari reparti. Il sospetto diagnostico di 719 pazienti dei 744 non ricoverati era: 379 dolore toracico non traumatico comparso > 12 ore prima del ricovero, 23 dolore toracico < 12 ore, 208 pazienti valutati all'ammissione secondo la stratificazione TIMI RISK SCORE presentavano sintomatologia cardiologica (dispnea, segni di scompenso, aritmia con o senza la comparsa di dolore toracico), 41 dolore toracico traumatico, 16 coma, 8 arresto cardiaco, 17 cervicobrachialgia, 2 intossicazione da farmaci e 12 astenia. 13 pazienti hanno rifiutato il prolungamento del ricovero.

Discussione. Rispetto alle indicazioni fornite dal protocollo aziendale, una singola determinazione di TnI è stata richiesta in 46% dei pazienti esaminati. L'analisi dei sospetti diagnostici dei 719 pazienti valutati ci permette di considerare giustificata la richiesta nei pazienti con dolore toracico > 12 ore, nei pazienti con sintomi ischemici (36.5%). Dei 432 pazienti ricoverati dopo un dosaggio di TnI il 78% è stato considerato appropriato (ricovero in cardiologia). Il 2.4% dei pazienti non è valutabile. Non ci sono evidenze sull'appropriatezza di una singola richiesta nei dolore traumatici e nei coma. In 39 pazienti (2.4%) la richiesta può essere considerata inappropriata. Per una migliore appropriatezza nell'uso di TnI un intervento è apparso necessario per almeno il 20% dei pazienti (dati non valutabili, condizioni cliniche non ischemiche, pazienti ricoverati in Reparti diversi dalla cardiologia).

LIVELLI SIERICI DI FETUINA A, MATRIX GLA PROTEIN (MGP) ED ISTOMORFOMETRIA OSSEA NELLA OSTEODISTROFIA RENALE

D-08

Ruggeri M.¹, Manni M.¹, Coen G.², Ballanti P.³, Bonucci E.³, Bruno F.¹, Grandi F.⁴, Sorbo G.¹, Balducci A.¹

A.O.S.Giovanni-Addolorata¹, Ospedale Israelitico², Università La Sapienza³, Hosal SpA⁴. Roma

Scopo del lavoro. La MGP e la Fetuina A si riscontrano nell'osso e nel siero; si liberano nelle fasi di accelerazione del turnover osseo con aumento del riassorbimento osteoclastico per formare un complesso MGP-Fetuina-Calciofosfato che solubilizza i sali di Calcio impedendone la precipitazione nei tessuti molli extrascheletrici. La Fetuina A è una proteina non collagenica presente nel siero ed in concentrazione elevata nella matrice ossea. In vitro modula il processo di riassorbimento osseo con un effetto antagonista alle citochine TGFβ, proteine attivanti l'osteogenesi. La sua concentrazione nell'osso aumenta nettamente nella Osteodistrofia renale, con contemporanea riduzione a livello plasmatico. Questo studio si propone di valutare le possibili associazioni tra i parametri del turnover osseo del paziente con Osteodistrofia renale ed i livelli circolanti di queste due proteine.

Materiali e metodi. Lo studio è stato eseguito su 38 pazienti in trattamento emodialitico, età 55,2 +/- 11a, M/F 27/11 che non assumevano vitamina D, sottoposti a biopsia ossea per valutazione istomorfometrica ed istodinamica. I dosaggi dei livelli sierici di MGP e di Fetuina A venivano eseguiti con metodica ELISA.

Risultati. I livelli sierici di MGP erano nel range della normalità (4+/-5 nmol/L) mentre quelli della Fetuina A erano più bassi rispetto alla norma (0,23 +/- 0,1 ng/ml, v.n. 0,52 +/- 0,15). È stata riscontrata una correlazione positiva non significativa tra le due proteine. I livelli sierici di Fetuina A nell'Iperparatiroidismo, nella Osteodistrofia Mista e nella Osteodistrofia a basso turnover erano confrontabili (0,219 +/- 0,1, 0,27 +/- 0,1 e 0,197 +/- 0,1 ng/ml rispettivamente). Quindi i livelli sierici di Fetuina A non erano influenzati dal tipo di Osteodistrofia renale. Tuttavia nei casi con Iperparatiroidismo e Osteodistrofia Mista (32 pz), la Fetuina A correlava negativamente con i parametri di formazione dell'osso OV/BV, OS/BS, ObS/BS ed anche con l'OcS/BS (p<0,05). Nei 6 pazienti affetti da patologia ossea a basso turnover le correlazioni con i parametri di rimodellamento osseo non raggiungevano i livelli di significatività.

Conclusioni. La Fetuina sierica è inversamente associata ai processi di rimodellamento osseo. Nella patologia a basso turnover i livelli sierici non erano più elevati rispetto all'Iperparatiroidismo ed alla Osteodistrofia Mista e non correlavano con i parametri di turnover osseo. Pertanto è probabile che la Fetuina sierica sia in rapporto con la formazione ossea in quanto inibitrice della attività osteogenica del TGFβ. Laddove il turnover osseo è molto basso l'effetto della Fetuina non sembra essere rilevante.

HbA1c, Pressione Arteriosa a Riposo e Risposta Pressoria allo Sforzo: Il Laboratorio ed il Quesito Clinico

D-09

°Rossi L., °Casini M., °Olivieri L., Matteucci E., Rosada J., Pallini M., Evangelista I., Giusti C., Giampietro O., °Innocenti B.

Dip. Medicina Interna, Università di Pisa, °Lab Analisi 1, Az. Osp. Univ. Pisana

Scopi del Lavoro. Analizzare la relazione tra risposta pressoria al test da sforzo e indici del metabolismo glucidico in adulti sani. Negli adulti non diabetici il rischio di patologia cardiovascolare e la mortalità totale aumentano con i livelli di HbA1c. In uomini sani, non diabetici né ipertesi, la glicemia a digiuno è risultata associata con i valori pressori a riposo e durante esercizio e con il rischio di ipertensione arteriosa.

Materiali e Metodi. 95 soggetti sani (44±13 anni), senza patologia coronarica nota, sottoposti a test da sforzo al cicloergometro. Misurati: peso corporeo, pressione arteriosa, glicemia (FPG) ed insulinemia a digiuno (FPI), HbA1c. Resistenza all'insulina stimata in base all'homeostasis model assessment (HOMAIR).

Risultati. BMI 25±4 kg/m², pressione media 92±11 mmHg, FPG 5.0±0.5 mmol/l, FPI 8.9±4.1 μU/ml, HbA1c 5.3±0.4%. Pressione arteriosa sistolica a riposo correlava positivamente con età (p<0.0001), BMI (p<0.0001), FPG (p<0.001), e HOMAIR (p<0.0001). La pressione sistolica massima raggiunta durante il test da sforzo correlava positivamente con la pressione sistolica a riposo (p<0.0001) e, con BMI (p<0.001), FPG (p<0.001), e HOMAIR (p<0.0001). L'aumento della pressione sistolica prodotto dall'esercizio correlava positivamente con età (p<0.01), pressione sistolica e diastolica a riposo (p<0.05 e 0.01, rispettivamente), e HbA1c (p<0.001). Analisi regressione multipla: pressione diastolica (coefficient 0.005, F value 7) e concentrazione di HbA1c (0.16, 11) quali variabili significativamente associate con un'esagerata risposta pressoria al test da sforzo (|r|=0.44, p<0.0001).

Discussione e Conclusioni. E' nuova l'osservazione che i livelli di HbA1c, e non quelli della glicemia a digiuno, influenzano nettamente l'incremento della pressione sistolica in risposta all'esercizio in individui sani. Questo è il primo studio che mette in relazione, in una popolazione sana, un indice del controllo glicemico a lungo termine con le variazioni della pressione sistolica durante l'attività fisica. L'HbA1c permette di valutare anche valori glicemici postprandiali, che studi epidemiologici hanno trovato associati con il rischio cardiovascolare indipendentemente dalla glicemia a digiuno. La glicosilazione non enzimatica potrebbe essere rilevante anche in soggetti sani, come suggerito dall'associazione tra HbA1c e mortalità cardiovascolare negli adulti. Infatti, la compliance arteriosa dipende da pressione media, funzione endoteliale, tono vasale, struttura e composizione della parete arteriosa (quindi, alterazioni della matrice proteica, secondarie all'accumulo di prodotti della glicazione avanzata).

LO SPERMIOGRAMMA ED IL SUO RUOLO NELLA DETERMINAZIONE DELLO STATO DI FERTILITÀ DI UN MASCHIO

D-10

Marcolla A.*, Fattor M.*, Caprioli A.*, Amadori PL.**

* Dipartimento di Medicina di Laboratorio APSS Trento- Laboratorio di Cles(TN); **Servizio ambulatoriale di Endocrinologia APSS Trento

Scopo del lavoro: Quello di valutare alcuni parametri dello spermioγραμμα secondo le indicazioni del manuale WHO del 1999 (o adattamenti dello stesso), in una popolazione maschile afferente ad un Laboratorio di analisi di un Ospedale Zonale (Cles-Trento).

Materiali e metodi. Sono stati esaminati 254 campioni di liquido seminale di soggetti che sono sottoposti volontariamente all'esame su indicazione o del proprio MMG o dello specialista andrologo. Solo in rari casi, erano note le motivazioni della richiesta. L'esame dell'eiaculato è stato eseguito mettendo in pratica per quanto possibile le linee guida delineate nell'ultima edizione (1999) del manuale "WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucos interaction". Per ogni eiaculato si sono valutate: la concentrazione degli spermatozoi, la loro morfologia e motilità; l'eventuale presenza di anticorpi anti-spermatozoo; la presenza di leucociti nell'eiaculato; la percentuale di nemaspermi morti nel caso di immobilità >50%.

Risultati. La percentuale di soggetti azospermici è risultata pari al 7,87%, mentre la percentuale di soggetti oligospermici (<20X10⁶ sp./ml oppure <20X10⁶ sp./eiaculato) è del 21,37%. Su 254 campioni esaminati il 74,36% presenta alterazioni morfologiche (secondo il manuale WHO del 1992 un eiaculato presenta morfologia anomala quando meno del 30% di spermatozoi sono morfologicamente normali). Il 41,03% dei campioni presenta motilità anomala (A<25%; A+B<50% secondo WHO '99). Non sono state soddisfatte le seguenti ipotesi: 1) All'aumentare del numero di spermatozoi con morfologia anomala aumenta il numero di spermatozoi immobili 2) All'aumentare del numero di spermatozoi con morfologia normale aumenta il numero di spermatozoi con motilità lineare e veloce 3) All'aumentare della concentrazione degli spermatozoi aumenta il numero di nemaspermi morfologicamente normali 4) All'aumentare dell'età dei pazienti peggiora la morfologia, la motilità e la concentrazione dei nemaspermi.

La maggior parte delle richieste di analisi dell'eiaculato deriva da uomini di età compresa tra i 30 ed i 40 anni. Più della metà dei pazienti si sottopone ad un unico controllo; tra quelli che si sottopongono a più di un controllo, neanche il 20% lo fa a distanza di tre mesi.

Conclusioni. La percentuale di soggetti azospermici non è indifferente. Questo può essere segno di un'alta incidenza di problemi legati ad insufficienza testicolare, ostruzione dei dotti testicolari, epididimali ed escretori, all'assenza congenita e bilaterale dei deferenti e delle vescichette seminali. L'analisi della morfologia, così come della motilità, è caratterizzata da una spiccata soggettività; la difficoltà risiede soprattutto nell'identificazione degli spermatozoi non spiccatamente anomali né chiaramente normali e nell'identificazione degli spermatozoi con motilità lenta, lineare o meno, o discinetica. La concentrazione valutata tramite camera di Makler non è soggetta a grossa variabilità, purché il campione venga ben miscelato e vengano utilizzati piccoli volumi di sperma (Yanagida K et al., 1990). Il problema legato all'autoimmunità rilevato dal MAR test non risulta particolarmente accentuato nella popolazione esaminata. Interessante il fatto che nessun eiaculato appartiene a giovani con meno di 18 anni; a quest'età infatti l'analisi del liquido seminale non ha significato, in quanto lo sviluppo sessuale del ragazzo può essere incompleto. I protocolli stabiliscono come per una corretta valutazione dello stato di fertilità o meno di un individuo siano necessari almeno tre controlli a distanza di tre mesi l'uno dall'altro. Questo perché le caratteristiche dell'eiaculato presentano delle variazioni in relazione a cambiamenti di stagione, allo stato fisico del paziente, etc. Più della metà dei pazienti si sottopone però ad un unico controllo. Questo rende conto della necessità di un approccio più corretto all'analisi dell'eiaculato. Prima di iniziare una terapia o comunque di prendere decisioni importanti nel caso in cui l'esame risulti alterato, è necessario ripetere lo spermioγραμμα più volte con controlli ad almeno tre mesi di distanza l'uno dall'altro.

SORVEGLIANZA DELLA LEGIONELLOSI NELLA PROVINCIA DI ORISTANO**E-01****N. Camusso, C. Mannuzzu**

Serv. Medicina di Laboratorio P.O “ San Martino” A.S.L n° 5 Oristano

Scopo del lavoro. Dal 2002, è stato attivato, presso la nostra azienda un'indagine per la valutazione del rischio legionellosi nelle strutture ricettive, comunitarie e nosocomiali, ricadenti nella A.S.L n° 5 di Oristano.

Materiali e metodi. La scelta dei punti di prelievo hanno sempre coinvolto l'acqua fredda e l'acqua calda in un punto terminale e quando possibile l'acqua calda sanitaria in un punto di accumulo. Il prelievo viene effettuato in bottiglie sterili, contenenti 0,5 ml/l di una soluzione 0,1 N di Tiosolfato di Na. Il campione viene filtrato su di una membrana di policarbonato con porosità 0,2 mm. La membrana viene risospesa in 10 ml di acqua del campione. Parte della sospensione viene trattata a 50 °C per 30 min. 0,1 ml di campione trattato e non vengono seminati su una piastra di terreno selettivo per legionella, incubate a 36/37° C in ambiente umido con il 2,5 % di CO₂. Le piastre vengono esaminate ad intervalli di 2/4 giorni per un periodo di dieci giorni. Ogni colonia sospetta viene seminata sia su BCYE Agar sia su CYE, senza supplementi di crescita. Dopo incubazione a 37°C per 48 h le colonie presunte di legionelle, che presentano crescita sul terreno completo ed in assenza di crescita sul terreno di base, vengono identificate attraverso prove di agglutinazione al lattice.

Risultati. Delle 45 strutture analizzate 21 sono risultate contaminate, in particolare su 731 campioni esaminati, 217 sono risultati positivi e di questi il 77 % mostrano una concentrazione maggiore a 1000 UFC/L (al di sopra del valore soglia, previsto dalle linee guida per rischio di infezione).

Discussione e Conclusioni. Dai risultati ottenuti si può affermare che nella prov. di Oristano, la legionella è ampiamente diffusa. Noi quindi riteniamo che la sorveglianza della legionellosi, se da un lato deve includere la ricerca del germe negli impianti idrici e di condizionamento, delle strutture ricettive, dall'altro deve assolutamente prevedere l'attivazione di una sorveglianza clinica attraverso una maggiore attenzione diagnostica nei confronti di tutte le polmoniti nosocomiali e non. Solo così anche la Sardegna inizierà a notificare al pari delle altre regioni Italiane.

IMPIEGO DI UN SISTEMA ISOLATORE PER I TEST DI STERILITÀ**E-02****Azzola S., Martin R., Bizzaro N.**

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo (UD)

Scopo dello studio. Verificare un sistema di lavoro che permetta di minimizzare i rischi di contaminazione da parte dell'operatore nel corso della esecuzione dei test di sterilità.

Materiali e Metodi. I test di sterilità sono stati effettuati presso i laboratori di un'industria farmaceutica con il metodo della filtrazione su membrana all'interno di un sistema isolatore di recente produzione (La Calhene, Vendôme, Francia) che utilizza come agente sterilizzante dell'ambiente il perossido d'idrogeno in forma gassosa. In più sedute, sono stati analizzati 35 campioni sterili costituiti da principi attivi farmacologici e altrettanti campioni inoculati con differenti batteri, muffe e lieviti. Tutti i campioni sono stati solubilizzati e filtrati attraverso una membrana di estere di cellulosa con un diametro medio dei pori di 0.45µm e una porosità del 75%. Dopo la filtrazione, la membrana è stata inoculata in due diversi terreni di coltura: Fluid Thioglycollate Medium (FTM) e Tryptone Soya Broth (TSB) che sono stati incubati rispettivamente a 32.5 °C e a 22.5 °C per 14 giorni. La lettura è stata eseguita quotidianamente osservando la torbidità del terreno. In caso di torbidità nei campioni sterili, il protocollo prevedeva l'allestimento di subculture in agar thioglycollate e tryptone soya per isolare e successivamente identificare i microrganismi sviluppati. Per la verifica dell'avvenuta sterilizzazione si sono utilizzati dei bioindicatori inoculati con spore di *Bacillus stearothermophilus*, batterio dotato di elevata resistenza al H₂O₂, e per il controllo dell'omogenea diffusione dei vapori si sono usati degli indicatori chimici che virano il colore a determinate concentrazioni dell'agente sterilizzante. Una volta sottoposti al ciclo di sterilizzazione, i bioindicatori sono stati inoculati in terreni di coltura e incubati per una settimana a 55-60 °C per verificare il buon esito del processo di sterilizzazione.

Risultati. Nei test di sterilità, i campioni sterili non hanno evidenziato nessuna crescita microbica, mentre nei campioni contaminati si è osservata la torbidità dei terreni confermando da un lato che il processo è avvenuto in ambiente sterile e dall'altro che nei campioni contaminati la crescita dei microrganismi non era inibita. Nei bioindicatori non si è registrata la crescita di colonie di *B. stearothermophilus*.

Discussione e Conclusioni. Il metodo di lavoro da noi utilizzato nell'esecuzione dei test di sterilità e l'impiego del sistema isolatore si sono dimostrati del tutto affidabili, ottenendo risultati del saggio accurati e ripetibili. In particolare, l'impiego di isolatore con H₂O₂, il cui utilizzo è oggi limitato ai laboratori di ricerca, potrebbe essere vantaggiosamente introdotto nei laboratori di microbiologia clinica per una maggior sicurezza ed efficacia delle prove di sterilità.

BATTERIURIA ASINTOMATICA NEI PAZIENTI DIABETICI AMBULATORIALI**E-03**

°Rossi L., °Leonetti P., °Falleni M., °Pisaturo F., °Casarosa S., °Bartolino T., °Costanzo S., °Severini L., °Tognetti I., °Rosellini A., °Vallini E., Matteucci E., Cecchi M., Troilo A., Soldani I., Bekele Burru M., Giampietro O., °Innocenti B.

Dipartimento di Medicina Interna, Università Pisa; °Lab. Chimica Clinica e Microbiologia I, A.O.U. Pisana

Scopo del Lavoro. Le sepsi urinarie sono spesso asintomatiche nella popolazione diabetica e, per tale motivo, possono restare non diagnosticate. La prevalenza della batteriuria asintomatica (ASB) nel diabete mellito non è stata determinata con certezza. L'età, la durata del diabete e la presenza di complicanze diabetiche sono state trovate associate alla presenza di ASB, non invece (almeno finora) i livelli di HbA1c, glicemia o glicosuria. Abbiamo eseguito esame urinoculturale per germi comuni in tutti pazienti diabetici, tipo 1 e tipo 2, che si sono presentati a visita ambulatoriale per due mesi consecutivi. La presenza di batteri nelle urine, in assenza di sintomi clinici, è definita batteriuria asintomatica (carica microbica e"100000 c.f.u./ml).

Materiali e Metodi. Sono stati esaminati 511 pazienti con diabete mellito: 64 con diabete tipo 1 (T1DM, 37F/27M, età 49±13 a, durata di malattia 23±15 a) e 447 con diabete tipo 2 (T2DM, 217F/230M, 66±10 a, 12±10 a). Nella stessa occasione, sono stati determinati: glicemia a digiuno (FPG), HbA1c, creatininemia e clearance, escrezione urinaria di albumina (UAE, espressa come µg/mg creatinina urinaria).

Risultati. La frequenza di batteriuria significativa era maggiore nei T1DM (12.5%, 8 di 64) che nei T2DM (9.8%, 44 di 447, p<0.05). I T1DM avevano livelli più elevati di FPG (10.9±4.5 vs 9.0±2.6 mmol/l, p<0.001) e HbA1c (8.2±1.4 vs 7.4±1.2 %, p<0.001). I sintomi urinari non erano assolutamente associati alla presenza di ASB. I 52 diabetici con ASB differivano dai 442 pazienti senza batteriuria per sesso (44F/8M vs 197F/245M, p<0.001), FPG (10.1±3.5 vs 9.2±2.9 mmol/l, p<0.05), HbA1c (7.8±1.1 vs 7.5±1.3 %, p<0.05), e UAE (mediana 13.8 vs 7.6 µg/mg, p<0.01).

Discussione e Conclusioni. La batteriuria asintomatica è frequente nel diabete mellito, maggiormente nel tipo 1 che nel tipo 2, e si accompagna ad un peggiore controllo glicometabolico (causa e/o effetto?). Sembra quindi indicato il suo trattamento antibiotico, anche se, dal punto di vista clinico, il contributo dell'ASB alla morbilità a breve (sviluppo di sepsi urinaria sintomatica) e lungo termine (nefropatia) del paziente diabetico non è stato determinato.

COMPARAZIONE TRA TESTS ELISA, IFA, ED RFC PER LO SCREENING DI INFEZIONI RESPIRATORIE SOSTENUTE DA CHLAMYDIA**E-04**

Santini M.C., Nocita E., Vitali D., Amendola L., Alecci A., Galli G. A.

U.D. di Medicina di Laboratorio ASF 10, Osp. S.M. Annunziata, Bagno a Ripoli (FI)

Al genere Chlamydia appartengono tre diverse specie: la C. Trachomatis responsabile di infezioni a trasmissione sessuale, la C. Psittaci agente eziologico dell'Ornitosi-Psittacosi, e la C. Pneumoniae responsabile di infezioni broncopulmonari e talvolta di patologie cardiovascolari su base ateromatosa.

Scopo del lavoro: valutazione di due tests immunoenzimatici basati sulla ricerca di anticorpi (IgG/IgM) in comparazione con tests in RFC ed IFA, per la diagnosi delle forme respiratorie sostenute da Chlamydia.

Materiali e Metodi: sono stati valutati 69 sieri selezionati di pazienti afferenti al nostro laboratorio. Su tali campioni sono stati eseguiti:

- 1- Test Bouty-Vircell Chlamydia Species Elisa IgG/IgM (pozzetti coattati con antigene LPS di Chlamydia)
- 2- Test Bouty-Vircell Chlamydia Pneumoniae Elisa IgG/IgM (pozzetti coattati con antigene purificato COMP di C. Pn.)
- 3- CFT-MAT ditta DIESSE per C. Psittaci

Come comparazione è stato utilizzato il test Bouty-Vircell Chlamydia Pneumoniae IFA IgG/IgM (slide con C. Pneumoniae ceppo CM-1, con C. Trachomatis ceppo 434, con C. Psittaci ceppo 6BC).

Risultati: dei 69 campioni

- Il 32% (22/69) è risultato ELISA IgG positivo per C. Species: tale dato è stato confermato dagli altri tests da noi eseguiti;
- Il 68% (47/69) è risultato ELISA IgG negativo per C. Species. Tale dato è stato confermato dagli altri test solo nella misura del 12,7% (6/47), mentre il 70% (33/47) è risultato C. Pn IgG positivo (test ELISA ed IFA). Il restante 17,3% (8/47) è risultato C. Pn. IgG negativo (test ELISA) ma RFC e IFA positivi per C. Psittaci;
- Il 2,9% (2/69) è risultato IgM positivo, dato confermato dagli altri tests da noi eseguiti .
- Il 97,1% (67/69) è risultato IgM negativo: di questa percentuale il 97% (65/67) è stato confermato dagli altri tests mentre il 3% (2/67) è risultato debolmente positivo per C. Psittaci.

Discussione e Conclusioni: in base alle comparazioni con gli altri test i risultati ottenuti indicano che non è possibile utilizzare quale unico test per lo screening delle forme respiratorie da Chlamydia il test Bouty-Vircell Chlamydia Species Elisa IgG/IgM. Considerato che circa il 40% della popolazione adulta possiede anticorpi anti-Chlamydia, riteniamo che l'utilizzo dell' antigene LPS da parte del suddetto test possa determinare la non congruenza dei risultati. In definitiva si ricorrerà al test per Ch. Psittaci in RFC e al test Bouty-Vircell Chlamydia Pneumoniae Elisa IgG/IgM che risultano correlati in modo significativo al test IFA.

VALUTAZIONE DI UN METODO CULTURALE RAPIDO PER LA RICERCA DI STREPTOCOCCUS AGALACTIAE**E-05****Nisticò S., Leone R.A., Minchella P., Potente G.I., Cerminara M.T., Luciano A.**

U.O. di Microbiologia e Virologia, A.S. n. 6, via A. Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Scopo del lavoro. Lo Streptococcus agalactiae (SGB), gruppo B di Lancefield, è riconosciuto come agente etiologico di polmonite, meningite e gravi sepsi neonatali acquisite, durante il passaggio nel canale del parto, da madri portatrici. Il CDC dal 1996 raccomanda una strategia di prevenzione con uno screening culturale per la ricerca di SGB su tampone vaginale e/o rettale in donne nella 35a -37a settimana di gestazione per instaurare, in caso di positività, una opportuna profilassi. L'esame culturale classico necessita in genere di 60-90 ore; è pertanto opportuno un sistema diagnostico più rapido, ma ugualmente sensibile e specifico. E' disponibile un terreno liofilo in tubo che riduce i tempi di risposta a 18-48 ore, del quale abbiamo testato sensibilità e specificità.

Materiali e metodi. Terreno liofilo in tubo (INSTANT GRANADA MEDIUM, Ditta ALIFAX) con metotrexate, agente selettivo potenziante il pigmento carotenoidico che le colonie di SGB producono spontaneamente. I terreni sono stati incubati a 37°C per 18 ore, osservando la presenza di colonie colore arancione, indice di positività; i tubi negativi sono stati reincubati fino a 48 ore. Per valutare la specificità abbiamo inoculato 40 tubi con vari ceppi di enterobatteri, streptococchi non SGB, stafilococchi, lieviti, neisserie, corinebatteri, della nostra ceppoteca. La sensibilità è stata valutata sia inoculando n. 5 tubi in doppio con diluizioni scalari di un ceppo di SGB a diverse concentrazioni (500-250-120-60-30 UFC/ml), sia altri 5 tubi in doppio con le stesse concentrazioni di SGB, ma con l'aggiunta in ognuno di alte concentrazioni (1.000.000 UFC/ml) di Escherichia coli.

Risultati. Tutti i 40 tubi inoculati con germi diversi dallo SGB hanno dato crescita di colonie incolori, mentre i 10 tubi inoculati con le diluizioni scalari di SGB hanno sviluppato colonie di colore arancione già dopo 18 ore. Inoltre anche i 10 tubi inoculati con Escherichia coli e con diluizioni scalari di SGB hanno sviluppato, compresi quelli con diluizione di 60-30 UFC/ml, delle evidenti colonie di colore arancione oltre alle colonie incolori di Escherichia coli.

Discussione e conclusioni. Dai risultati ottenuti si può evincere che i germi non SGB danno nel terreno testato colonie incolori (risultato negativo), mentre gli SGB inoculati, anche a cariche molto basse, producono sempre colonie di colore arancione (risultato positivo). La facilità d'uso, i tempi di identificazione più brevi, la possibilità di poter evidenziare anche i rari ceppi non beta-emolitici di SGB, rendono tale terreno adatto non solo allo screening sulle donne in gravidanza, ma anche per una diagnosi tempestiva di infezione da SGB nei neonati da madri non sottoposte a screening.

UN CASO CLINICO DI PERITONITE BATTERICA DA FLAVIMONAS ORYZIHABITANS IN PAZIENTE IN DIALISI PERITONEALE**E-06****G. Catanoso*, M. Ripamonti*, P. Erba*, E. Cecchetti°, M.B. Zani°, B. Mazzei°°**

* U.O. Laboratorio Analisi; ° U.O. Nefrologia e Dialisi; °° Direzione Medica; A.O. "Ospedale di Circolo di Busto Arsizio" P.O. di Tradate

Premessa: il Flavimonas Oryzihabitans (F.O.) è un germe Gram -, di origine ambientale, presente in ambiente umido (tipicamente nelle risaie). Considerato assai raramente patogeno, è stato associato, soprattutto in pazienti immunodepressi, a batteriemie correlate ad infezioni da catetere venoso e, eccezionalmente, a peritoniti in soggetti in dialisi peritoneale ambulatoriale continua (CAPD).

Caso clinico: paziente di 53aa, in dialisi peritoneale automatizzata domiciliare, viene ricoverato presso la nostra U.O. di Nefrologia e Dialisi per dolore addominale e torbidità dell'effluente peritoneale in assenza di iperpiressia e con modesta leucocitosi. Viene posta diagnosi di peritonite; dall'esame culturale del liquido peritoneale si identifica un Flavimonas Oryzihabitans. Risultano negative sia la coltura del tampone nasale, sia la coltura dell'emergenza cutanea del catetere peritoneale; viene iniziata terapia con cefalosporine di seconda generazione, per 14 giorni consecutivi per via intraperitoneale, con rapida risoluzione della sintomatologia. Dopo 10 gg dalla sospensione della terapia, un nuovo es. culturale dell'effluente peritoneale risulta negativo.

Materiali e Metodi: la coltura diretta del liquido peritoneale effettuata su agar cna, cioccolato e Mac Conkey ha dato esito negativo. Dopo arricchimento in brodo thio-glicollato e successiva semina su agar cioccolato e Mac Conkey sono cresciute colonie rugose, aderenti al terreno, lattosio non fermentanti, di colore giallo intenso e negative alla prova della ossidasi. Il batterioscopico ha evidenziato bacilli Gram - che testati con il sistema Vitek Biomerieux sono stati identificati come Flavimonas Oryzihabitans.

Conclusioni: Il paziente ha riferito di avere seguito scrupolosamente le norme igieniche indicate per soggetti in dialisi peritoneale ambulatoriale continua fatto salvo il corretto uso di una spugna per l'igiene personale. Come già riportato in un case report di infezione di un catetere di Hickman, la spugna sembra rappresentare un terreno favorevole alla crescita del germe e, pertanto, può essere considerata come probabile fonte d'infezione. Inoltre, il F.O., in relazione alle segnalazioni riportate attualmente in letteratura, non dovrebbe essere più considerato come eccezionalmente coinvolto nella genesi di peritonite batterica in soggetti in CAPD, ma un agente causale, sia pur raro, di peritonite batterica.

CONFRONTO TRA ABITUDINI PRESCRITTIVE E ANTIBIOTICO-RESISTENZA SUL TERRITORIO: DUE ANNI DI OSSERVAZIONE

E-07

Bianco I.¹, De Vita F.², Cicchini D.³

1 Patologia Clinica Ospedale Lanciano 2 Farmacia Ospedale Lanciano. 3 Servizio Farmaceutico Territoriale Asl 103 Lanciano-Vasto

Scopo del lavoro: l'aumento delle resistenze dei batteri agli antibiotici rappresenta uno tra i maggiori problemi nella terapia delle infezioni, un loro uso corretto può contribuire a rallentare questo fenomeno. Scopo del lavoro è fornire ai Medici di Medicina Generale strumenti per la scelta dell'antibatterico mirato e più efficace.

Materiali e metodi: sono stati analizzati nel 2003-2004 i consumi degli antibatterici in genere usati nelle infezioni delle alte vie aeree e delle vie urinarie, relazionandoli alla sorveglianza delle resistenze antimicrobiche sul territorio per le stesse patologie. La sorveglianza microbiologica prevede, per le patologie indicate, il monitoraggio delle resistenze ai macrolidi per Streptococco b-emolitico-A, ai fluorochinoloni e carbapenemici per Pseudomonas, ai fluorochinoloni e produzione di β -lattamasi a spettro esteso (ESBLs) per Enterobatteri. Gli antibiogrammi, refertati per molecole individuate per sito di infezione, sono stati eseguiti per Gram- con card Vitek-Biomérieux, per Gram+ ed ESBLs con E-test (AB Biodisk) secondo Clinical and Laboratory Standards Institute. I dati statistici sono stati ottenuti tramite software Vitek; i dati di consumo tramite software Marno del Servizio Farmaceutico. Per gli antimicrobici è stata utilizzata la classificazione ATC, sono state analizzate le ddd-totali (definite-daily doses) e le ddd/1000 (abitanti/die) su 117.278 iscritti al SSN.

Risultati: gli antimicrobici più prescritti nelle rispettive classi sono stati (2003-2004): J01C amoxicillina/ clavulanico, J01D cefixime; J01F claritromicina; J01M levofloxacina in totale, ciprofloxacina per dosaggi urinari. Nel 2004 rispetto al 2003 sono diminuite rispettivamente le ddd/totali e ddd/1000 per benzil-penicillina (14,6%-14,84%), levofloxacina (9,55%-9,8%), ciprofloxacina (0,55%-0,82%), mentre sono aumentate claritromicina (4,64%-4,35%), cefalosporine 3a generazione (5,73%-5,45%) e amoxicillina/ clavulanico (5,4%-5,10%). Le resistenze rispettivamente nel 2003 e 2004 sono state: Streptococco b-emolitico A ad eritromicina (28%-31%); Pseudomonas a ciprofloxacina (60%-65%), ad imipenem (27%-29%); E.coli per ESBLs (29%-50%), a ciprofloxacina (24%-28%); P.mirabilis per ESBLs (25%-45%), a ciprofloxacina (21%-28%); K.pneumoniae per ESBLs (25%-25%) a ciprofloxacina (0%-3%).

Conclusioni: l'incremento delle resistenze per macrolidi e fluorochinoloni sembra collegato ad un aumento di consumi e/ o dosaggi inadeguati mentre per ESBLs l'aumento può dipendere da una terapia prevalentemente empirica. La collaborazione tra farmacista, microbiologo e clinico si rivela utile sul territorio, come in ospedale, per il controllo dell'antibiotico-resistenza attraverso l'informazione sull'epidemiologia locale e i consumi, il confronto sugli esami microbiologici e l'analisi dei dati.

LE CONTAMINAZIONI BATTERICHE NEI CONCENTRATI PIASTRINICI

E-08

Gessoni G., Valverde S., Traiuo E., Antico F., Giacomini A.

Dipartimento di Patologia Clinica A-ULS 14 Chioggia

Scopo del lavoro: La contaminazione batterica degli emocomponenti è un problema particolarmente rilevante nel caso dei concentrati piastrinici che possono essere conservati sino a 5 giorni a + 22°C, condizione questa che potrebbe favorire la crescita d'eventuali batteri presenti nell'unità. La contaminazione batterica degli emocomponenti può derivare, dalla cute del donatore o da una batteriemia transitoria asintomatica.

Materiali e Metodi: presso il Centro Trasfusionale di Chioggia, per eseguire le piastrino-afèresi si utilizza la strumentazione Hemonetics MCS plus con kit con filtro in linea per la leucodeplezione. Per ciascuna procedura sono stati ottenuti i seguenti campioni: tampone cutaneo del sito di prelievo prima e dopo disinfezione, sangue intero del donatore, aliquota del concentrato piastrinico dopo leucodeplezione. I tamponi cutanei sono stati coltivati per 48 ore a 37°C dopo semina su Agar sangue ed Agar sale mannite. I campioni sono stati inoculati in bottiglie da emocoltura ed esaminati con un sistema automatizzato di lettura (Bact-Alert, Bio-merieux) e continuamente monitorati per 7 giorni.

Risultati: dal gennaio 2002 al giugno 2004 disponevamo dei dati completi relativi a 128 procedure. Venticinque tamponi cutanei effettuati prima della disinfezione (19%) hanno sviluppato una crescita batterica: in 24 casi si trattava di uno Stafilococco epidermidis ed in un caso di Stafilococco aureus. Dopo disinfezione cutanea, eseguita con clorexidina digluconato-benzalconio cloruro, n. 5 tamponi cutanei (4%) ha sviluppato una crescita batterica, in 4 casi si è trattato di uno Stafilococco epidermidis ed in un caso di Stafilococco aureus. Le emocolture eseguite con i campioni di sangue intero, non hanno sviluppato colonie batteriche, mentre un campione di concentrato piastrinico è risultato positivo per uno Stafilococco epidermidis sviluppatosi in quarta giornata.

Discussione e Conclusioni: Nella nostra esperienza la contaminazione delle unità di piastrine da afèresi si è dimostrata un evento infrequente essendosi verificato in un caso su 128 procedure analizzate, pari al 0.78%. L'unità si presentava positiva per uno Stafilococco epidermidis ed era stata raccolta da un donatore i cui tamponi cutanei erano risultati negativi, così come la emocoltura da sangue intero. La crescita batterica era stata evidenziata in quarta giornata, dopo che la unità era già stata trasfusa, dopo 48 ore, ad un paziente ematologico senza alcun effetto collaterale. Nel caso osservato non è possibile evidenziare la sorgente della contaminazione anche se alcuni dati quali: la specificità del germe, la tardiva positività della coltura e la mancanza di effetti collaterali conseguenti alla trasfusione ci inducono ad ipotizzare uno sviluppo di carica batterica non significativa.

MONITORAGGIO DELLO SCOSTAMENTO DALLE PROCEDURE DI PROFILASSI ANTIBIOTICO RESISTENZA (AB): IL RE-AUDIT

E-09

Schinella M.^o, Mariotti G.*, Gualdi P.^o, Pasqualini A.[^], Simoncelli B.*

^oLab Patologia Clinica, *Direzione Medica, [^]UO di Farmacia. Ospedale Santa Maria del Carmine-38068 Rovereto (TN)

Scopo del lavoro: ri-verificare la corrispondenza operativa con le procedure di profilassi antibiotica (AB) illustrate nel "manuale" concordato nel 2003 per la prevenzione delle infezioni del sito chirurgico, ad opera del Comitato per il Controllo delle Infezioni Ospedaliere (CIO).

Materiali e Metodi: nella riunione del CIO del maggio 2005 sono stati presentati i dati relativi al monitoraggio dello scostamento dalle procedure di profilassi AB, effettuati su un campione di cartelle cliniche delle UUOO di Chirurgia (73 compresi 2 casi di appendicectomia in pazienti pediatrici) e Ortopedia (153). I casi del campione sono stati raccolti utilizzando come riferimento gli interventi chirurgici del periodo 1 dicembre-31 dicembre 2004. Di ciascun caso è stata rilevata la concordanza rispetto alle seguenti variabili: 1) profilassi secondo le indicazioni contenute nella procedura condivisa; 2) utilizzo del modulo di prescrizione di AB profilassi; 3) tempestività della prima somministrazione di AB (entro 30' dall'inizio dell'intervento); 4) durata profilassi (motivata se superiore alle 24 ore).

Risultati. Chirurgia: la profilassi è prescritta secondo le indicazioni nel 96% degli interventi di chirurgia della tiroide, mammella, ernia inguinale e chirurgia proctologica. Come indicato dalla procedura, nella chirurgia di colon-retto ed ileale non viene somministrata Cefoxitina. Il modulo di prescrizione è presente nel 86% delle cartelle cliniche. Il 65% dei moduli è compilato correttamente e la prescrizione è riportata in cartella. Nel 9% degli interventi la durata della profilassi è superiore alle 24 ore. Ortopedia: utilizzo della Cefazolina nel 76% degli interventi di mano, piede, ginocchio, artroscopie e della Ciprofloxacina nel 13% di altri interventi. Il modulo di prescrizione è presente nel 70% delle cartelle cliniche. Nel 84% dei casi il modulo è compilato correttamente. La durata della profilassi AB supera le 24 ore nel 45% degli interventi in cui viene utilizzata la Ciprofloxacina, mentre la durata della somministrazione di Cefazolina segue lo schema concordato con la procedura.

Discussioni e conclusioni: pur persistendo ancora margini di miglioramento, rispetto all'anno 2003 si è constatata una maggiore attenzione nella somministrazione dell'AB entro i 30 minuti dall'inizio dell'intervento, una riduzione della durata della profilassi sup. 24 ore e una maggiore attenzione nel compilare e conservare i moduli di prescrizione AB. Il re-audit ha evidenziato ancora una volta che lo "strumento" principale per gestire con efficacia un cambiamento in un sistema complesso, come l'ospedale, è il coinvolgimento partecipativo degli attori coinvolti e il ritorno informativo agli attori coinvolti.

SU DI UN CASO DI ENTERITE DA ARCOBACTER BUTZLERI

E-10

Bertiato G., Battistel M., Forni M., Modolo E., Papa N., Schiavon R., Zasio C.

Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e di Microbiologia, Ospedale "San Martino", Belluno

Introduzione. Ampiamente diffusi nell'ambiente, i batteri appartenenti al genere *Campylobacter* e ai due generi ad esso strettamente correlati *Helicobacter* ed *Arcobacter* sono conosciuti come tra i più comuni agenti responsabili di enterite nell'uomo, particolarmente in età pediatrica, e talora di batteriemia.

Caso clinico. Un paziente con diabete mellito, epatopatie esotossica, cardiopatia ischemica post-IMA, BPCO, EPA, viene ricoverato d'urgenza nel marzo 2005 per stato soporoso di n.d.d. Nel decorso clinico si nota un lento recupero delle abituali facoltà e dell'orientamento. Durante il ricovero dalla terza giornata presenta tre scariche diarroiche, senza febbre, sei in quarta, sette in quinta: viene richiesta coprocultura e iniziata terapia. Cessa subito la diarrea, il quadro clinico si risolve.

Materiali e Metodi. L'isolamento e l'identificazione di *Arcobacter* risultano difficoltosi. E' raccomandata la tecnica della membrana filtrante, che utilizza terreni non selettivi, al sangue o al carbone, con incubazione a 37°C, in condizioni di microaerofilia, protratta per 3-5 giorni per i *Campylobacter* "atipici" come le specie appartenenti al genere *Arcobacter*. Alcuni ceppi di *C. jejuni* e *C. coli* risultano inibiti da agenti antimicrobici come cefalotina, colistina e polimixina B, che possono essere presenti nei terreni selettivi; altre specie di *Campylobacter* (*C. concisus*, *C. sputorum*, *C. curvus*, ecc.) necessitano di incubazione in atmosfera microaerofila arricchita di idrogeno. Di conseguenza molti laboratori non identificano routinariamente queste specie di *Campylobacter*, la cui prevalenza rimane incerta. Il maggior inconveniente della tecnica su membrana filtrante è la minor sensibilità del sistema, paragonato ai terreni selettivi convenzionali. Per ottimizzare il recupero di *Campylobacteriaceae* da campioni fecali è raccomandabile l'uso contemporaneo sia di terreni selettivi, sia del metodo su membrana filtrante.

Risultati. L'esame colturale delle feci ha consentito l'isolamento di un ceppo di *A. butzleri* con caratteristiche di ampia sensibilità verso gli antibiotici testati. L'identificazione è stata confermata con tecniche di tipizzazione molecolare.

Conclusioni. *Arcobacter* è ampiamente diffuso ed è stato isolato da acque, da feci nell'uomo e di un'ampia varietà di animali. Le vie di trasmissione dell'infezione da *Arcobacter* non sono state ancora chiarite e possono comprendere contatti da persona a persona, consumo di acque contaminate e di cibi animali, specialmente pollame. La nostra conoscenza sul significato clinico di questi organismi è molto ridotta, ma è altamente probabile che *Arcobacter*, ed in particolare *Arcobacter butzleri*, debba essere annoverato tra i possibili agenti causali di patologie intestinali acute.

VALUTAZIONE DELLA BATTERIURIA MEDIANTE IRIS IQTM200 ED UF-100**E-11****De Rosa R., Biasin M., Cappelletti P.**

Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio A.O. "S. Maria degli Angeli" Pordenone.

Scopo del lavoro: valutare le performance diagnostiche, nel sospetto di infezione delle vie urinarie (IVU), del sistema di microscopia automatizzata intelligente IRIS iQTM200 (Instrumentation Laboratory®) e del citometro a flusso UF-100 (Sysmex TOA, Dasit®), rispetto al gold standard rappresentato dall'urocoltura per valutare la possibilità di eseguire uno screening rapido della batteriuria..

Materiali e metodi: sono stati processati 235 campioni di urine di pazienti ambulatoriali e ospedalizzati con sospetta IVU con i sistemi IRIS iQTM200 ed UF-100, pervenuti al Laboratorio con richiesta di esame colturale. E' stato valutato per ciascun campione, su UF-100, il numero di batteri e di WBC/ μL e, per IRIS iQTM200, il numero di elementi di piccole dimensioni (E.P.D.) e l'allarme semiquantitativo batteri. Su ogni campione è stata eseguita la semina con ansa calibrata su agar-CNA e agar-CLED (Cystine-Lactose Electrolyte Deficient) ed eventuale identificazione del germe isolato con il sistema Vitech.

Risultati: Sono risultati positivi all'urocoltura 74 campioni, mentre 162 non presentavano crescita batterica. Considerando positivi all'UF 100 i campioni con conte batteriche $>10.000/\mu\text{L}$ e/o WBC $>50/\mu\text{L}$, sono risultati concordanti 188 risultati su 235 (80%); all'iQ200, considerando positivi i campioni che presentavano un numero di E.P.D. $>10.000/\mu\text{L}$ e/o la presenza dell'allarme batteri, i risultati concordanti sono stati 177 (75,3%). UF-100 ha mostrato una sensibilità dell'85,1%, una specificità del 77,6% con valore predittivo positivo (VPP) di 46,3% e valore predittivo negativo (VPN) di 91,9%. IRIS iQTM200 ha evidenziato una sensibilità dell'83,7%, specificità del 71,7% con VPP di 48,8% e VPN di 90,6%. Gli isolati erano: 38 E.coli, 8 altri Gram-, 3 Enterococcus spp, 6 con 2 ceppi, 2 Candida, 1 Strepto gr B, 1 S. aureus, 1 S. epidermidis e 14 flora mista (FM). I falsi negativi per iQ 200 erano 6 FM, 1 Strepto. gr B, 3 E.coli a bassa carica e 2 Enterococchi; per UF-100 erano: 5FM, 1 Strepto. gr B, 3 E.coli a bassa carica, 1 Enterococco e 1 Candida.

Conclusioni: IRIS iQTM200 ed UF-100 hanno mostrato buone performance soprattutto in termini di sensibilità e VPN. I due strumenti non hanno mostrato differenze statisticamente significative. Inoltre è da notare come siano pressoché sovrapponibili i casi falsi negativi, costituiti d'altra parte da campioni verosimilmente contaminati (FM) o con carica bassa il cui significato clinico è da valutare.

MIGLIORAMENTO DEL TAT NELLA DIAGNOSI DELLE SEPSI**E-12****Marino MR., Mantini G., Gambi A., Tomei G., Marrone E., Martinotti S.**

Laboratorio di Patologia Clinica II Ospedale Clinicizzato "SS. Annunziata" Chieti

Scopo del lavoro. L'emocoltura ha assunto negli ultimi anni un'importanza crescente prevalentemente per un'aumento delle sepsi. Questo evento ha origine da vari fattori: la comparsa di nuovi agenti infettanti e di nuovi pattern di resistenza, l'aumento di fattori predisponenti, l'immunoconpromissione del paziente. Il referto che il laboratorio di microbiologia produce viene influenzato da molteplici fattori alcuni dei quali riguardano il reparto (ora, intervallo e numero di prelievi, accuratezza nell'esecuzione, correlazione tra prelievo da CVC e quello da vena periferica), altri il Laboratorio di Microbiologia, (caratteristiche del mezzo di coltura, scelta del sistema automatico per l'identificazione ed il TAT).

Lo scopo di questo lavoro è quello di dimostrare l'attuabilità di una refertazione "rapida e preliminare" entro 24 ore dalla positività dell'emocoltura, con l'identificazione precoce di contaminazioni ed una valutazione della sensibilità agli antibiotici.

Materiali e metodi. Nella procedura da attuare per l'esecuzione dell'emocoltura preliminare abbiamo definito le risorse (tecnologiche, umane, economiche e strutturali) che ci occorrevano, il tempo entro il quale questo metodo fosse stato validato e un indicatore di efficacia rappresentato dal N° di referti preliminari/N° di emocolture positive. Successivamente abbiamo definito il metodo con cui eseguire questo test ed gli antibiotici più idonei da testare in collaborazione con gli infettivologi. La tecnica messa a punto prevede:

- osservazione al microscopio dello striscio colorato secondo Gram dell'emocoltura positiva;
- esecuzione di un e-test preliminare a tre antibiotici differenti per gram positivi, gram negativi e miceti;
- semina del flacone positivo su terreni solidi scelti in base all'osservazione microscopica;
- lettura a 24 ore dell'e-test e refertazione preliminare
- conferma dell'identificazione ed antibiogramma con sistema automatico;

Discussione e conclusione. Durante il periodo Dicembre 2004-Agosto 2005 abbiamo analizzato 147 emocolture positive di cui 124 (87%) mostravano congruenza tra osservazione microscopica e esame colturale

14(9,5%) non erano congruenti. Per 5 di esse (3,5 %) non è stato possibile refertare l'emocoltura preliminare in quanto si trattava di germi a lenta crescita. L'esecuzione dell'emocoltura preliminare, migliorando il TAT da 72 ore a 24 ore dalla positività dell'emocoltura, si è dimostrata utile nella gestione delle sepsi indirizzando il clinico verso una terapia mirata e tempestiva.

IL REFERTO BATTERIOLOGICO: UN ESEMPIO DI RISPOSTA AL QUESITO CLINICO**E-13****Minetti F.*, Bona R.*, Calcagno G.°, Bedo M.^, Accinelli C.*, Beruto S.*, Campanella A.M.*, Reberto L.*, Rezza I.***

*Dipartimento di Patologia Clinica, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale San Paolo, ASL2, Savona; °U.O. Malattie Infettive, Ospedale San Paolo, ASL2, Savona; ^U.O. Farmacia, Ospedale San Paolo, ASL2, Savona

Scopo del lavoro. Scopo di questo lavoro è elaborare un referto microbiologico corredato di indicazioni utili ad indirizzare la scelta terapeutica secondo criteri standard e scientificamente riconosciuti.

Materiali e metodi. L'apparecchio VITEK-2 (BIOMERIEUX), utilizzato per le identificazioni batteriche e gli antibiogrammi, è stato abilitato al trasferimento sul referto delle MIC e delle raccomandazioni NCCLS richiamate dal sistema ESPERTO per gli Stafilococchi e gli Enterococchi. In accordo con la Commissione Terapeutica e l'U.O. Farmacia dell'ASL2 sono state raccolte le note del Prontuario Ospedaliero dell'ASL2 riferite agli antibiotici testati e si è calcolato il costo max/die della terapia antibiotica in base alla posologia media giornaliera del farmaco. Sono state poi configurate due maschere di refertazione separate per pazienti esterni ed interni.

Risultati. Si sono prodotte due tipologie di referto: 1) per i pazienti interni è riportata l'identificazione del microrganismo isolato con l'antibiogramma relativo. Accanto a ciascun antibiotico testato appare l'eventuale nota riportata dal Prontuario Ospedaliero, la posologia media/die e il costo massimo giornaliero della terapia antibiotica. Compaiono inoltre le raccomandazioni NCCLS per Stafilococchi ed Enterococchi; 2) per i pazienti esterni con identificazione ed antibiogramma compaiono le raccomandazioni NCCLS per Stafilococchi ed Enterococchi. Per tutti i pazienti, ad ogni antibiotico, oltre all'indicazione qualitativa "Sensibile", "Intermedio", "Resistente", è associata la MIC espressa in mcg/ml.

Discussione e conclusioni. L'indicazione della MIC rappresenta un utile supporto nel follow-up dell'infezione batterica, permettendo l'eventuale correzione mirata della terapia. Le raccomandazioni NCCLS riportate sul referto costituiscono un'indicazione importante per il Clinico nella valutazione dell'antibiotico da utilizzare, nell'ottica della prevenzione dell'insorgenza della resistenza. Il Medico Ospedaliero ha, da questo referto, ulteriori vantaggi: avendo a disposizione anche le note del Prontuario Ospedaliero ed il costo max/die della terapia antibiotica, può operare una scelta più oculata, valutando il rapporto costo/beneficio nell'ottica del contenimento della spesa sanitaria.

DETERMINAZIONE DELL'AMMONIO: INEFFICACIA DELLA REFRIGERAZIONE NEL MANTENIMENTO DELLA STABILITÀ DEL CAMPIONE**F-01****Mezzena G., Faresin B., Bedin L., Pozzo E., Giavarina D**

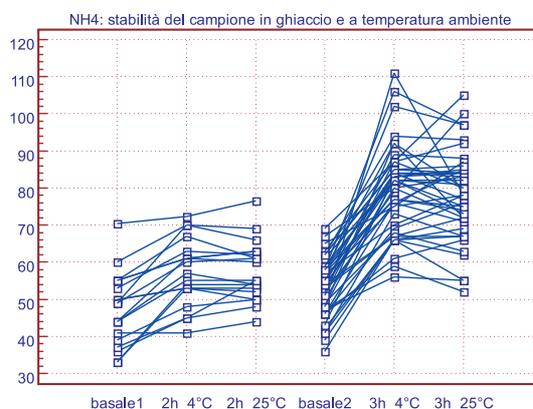
Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

Scopo del Lavoro. La determinazione dei livelli di ammonio in campioni di plasma o siero è fortemente influenzata dalle condizioni preanalitiche e dal tempo di esecuzione. Il trasporto in ghiaccio è raccomandato (Ann Clin Biochem 1994; 31:529-43), in associazione alla tempestività dell'esecuzione del test. Scopo di questo lavoro è verificare se e quanto la refrigerazione sia protettiva delle condizioni preanalitiche per questo test.

Materiali e Metodi. Sono stati comparati 19 campioni di soggetti adulti volontari sani, raccolti in triplo per NH_4 , al tempo zero (entro 5 minuti dal prelievo) e al tempo 120 minuti, dopo conservazione in provetta tappata refrigerata in frigo a 4°C e a temperatura ambiente (25°C). Altri 43 campioni sono stati valutati nello stesso modo dopo 3 ore di conservazione. Le determinazioni di NH_4 sono state eseguite su autoanalizzatore ADVIA 1650 (Bayer, Terrytown, USA) con metodo enzimatico diretto (Bayer).

Risultati. La differenza media tra t. 0 e t. 120 refrigerata è risultata da $47,2 \pm 9,7 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 42,5 a 51,9) a $57,3 \pm 9,0 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 53,0 a 61,7); $P < 0,0001$. La differenza tra campione refrigerato e non refrigerato a t. 120 è stata $57,3 \pm 9,0 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 53,0 a 61,7) contro $57,7 \pm 8,0 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 53,9 to 61,6); $p = \text{n.s.}$ La differenza tra t. 0 e t. 180 refrigerata è risultata $53,1 \pm 7,7 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 50,7 a 55,5) contro $79,3 \pm 11,9 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 75,7 a 83,0); $P < 0,0001$. La differenza tra campione refrigerato e non refrigerato a t. 180 è stata $79,3 \pm 11,9 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 75,7 a 83,0) verso $77,9 \pm 11,9 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 74,3 a 81,6); $p = \text{n.s.}$ (figura)

Conclusioni. Le differenze dei campioni conservati a 4°C e a 25°C sono risultate nulle. La refrigerazione è ininfluente nell'evitare l'incremento dei livelli di ammonio con il passare del tempo. Una corretta determinazione dell'ammoniemia necessita di una esecuzione tempestiva, indipendentemente dalle temperature di trasporto dei campioni interi.



MONITORAGGIO BIOCHIMICO DELL'IPERTENSIONE POLMONARE NELLA SCLERODERMIA**F-02****Finazzi S., Vicenzi E., Faggioli P.*, Giani L.*, Mazzone A.*, Lotzniker M.**

Laboratorio Analisi e * Medicina Interna A.O. Ospedale Civile di Legnano

Scopo del Lavoro. La sclerodermia complicata con ipertensione polmonare (IP) è gravata da prognosi peggiore; recentemente il trattamento con analoghi delle prostacicine o con antagonista del recettore dell'Endotelina sembrano offrire una buona capacità di intervento, soprattutto se la condizione è precocemente diagnosticata e trattata. L'approccio metodologico standard per la diagnosi di IP consiste nella misurazione della pressione polmonare (PAP) mediante ecodoppler; peraltro, a fronte di una diagnosi certa di IP per valori di PAP >40 mmHg, i valori tra 30 e 40 sono più difficilmente interpretabili anche in funzione dell'imprecisione della misura. Scopo del presente studio è di valutare l'utilità del parametro NT-proBNP in affiancamento a ecodoppler nella diagnostica dell'ipertensione polmonare sclerodermica.

Materiali e Metodi. Casistica: sono stati esaminati 60 pazienti giunti consecutivamente all'osservazione per sclerosi sistemica progressiva e sottoposti a ecodoppler per misurazione della PAP (vn fino a 30mmHg).

Determinazioni analitiche: NT-proBNP è stato determinato su siero mediante tecnica ECLIA su strumentazione Modular E170 (Roche Diagnostics); per la valutazione sono stati utilizzati i valori di riferimento per età e sesso forniti dal produttore. In 43 pazienti è stato eseguito un 2° campionamento per NT-proBNP a 5 giorni di distanza per valutare la stabilità del parametro.

Risultati. Nei pazienti con IP le mediane sono risultate statisticamente differenti ($p < 0.001$) rispetto ai pazienti senza IP (125 versus 72 pg/ml). Nel gruppo con PAP <30mmHg. (n=38) non si è rilevato nessun valore patologico di NT-proBNP, in quello con PAP tra 30 e 40mmHg (n=15) le concentrazioni del parametro sono risultate patologiche nel 27% dei casi (22% nell'intervallo 30-35 e 33% tra 35 e 40); la percentuale di positività sale al 57% in caso di PAP >40mmHg (n=7). Non si è riscontrata correlazione significativa ($r = 0.2$) tra PAP e NT-proBNP. I valori di NT-proBNP nei 2 campionamenti non sono risultati significativamente differenti.

Discussione e Conclusioni. Nella sclerodermia l'utilizzo combinato di NT-proBNP e PAP sembra migliorare la diagnosi di ipertensione polmonare soprattutto in presenza di pressioni polmonari "borderline". Si propone pertanto un algoritmo diagnostico che preveda l'osservazione biochimica mediante NT-proBNP in caso di PAP >30mmHg e successivamente per monitorare l'efficacia del trattamento farmacologico e l'evoluzione della patologia. Il costo relativamente contenuto, la precisione analitica e la conoscenza della variabilità biologica di NT-proBNP possono fornire al clinico uno strumento alternativo nella gestione della complicità polmonare sclerodermica.

AUTOMAZIONE DEL D-ROMS TEST: PERFORMANCE ANALITICHE ED APPLICAZIONI CLINICHE**F-03****Rosolia A.*, Di Leo T.*, Iorio E.L.°, Lipartiti T.***

* Analisi Cliniche MATER DEI Paganì (SA).; ° Osservatorio Internazionale Stress Ossidativo, Parma

Scopo del lavoro. Applicare ad un analizzatore multiplo la metodica manuale del d-ROMs test (determinazione dei metaboliti reattivi dell'ossigeno nel siero) e verificarne l'utilità clinica.

Materiali e metodi. Campioni di siero, conservati a -20°C, dopo essere stati ottenuti da 20 soggetti (18 M, 2 F), di età compresa fra 20 e 54 anni, apparentemente sani, regolari frequentatori di una palestra sportiva, sono stati sottoposti, nella medesima seduta analitica, alla determinazione del d-ROMs test (Diacron International, Grosseto) e del profilo lipidico, utilizzando il sistema Dimension ARX (Dade Behring Inc.). Per eseguire il d-ROMs test, a 400 uL di una soluzione di lavoro estemporanea (ottenuta diluendo 1:100 il reagente R1, N,N-dietilparafenilendiammina, nel reagente R2, buffer acetato, dell'apposito kit) sono stati aggiunti 4 uL di siero (starter); la variazione d'assorbanza è stata monitorata a 540 nm; i risultati sono stati espressi in U CARR (v. n. 250-300 U CARR), secondo la procedura standard, in cinetica, descritta da Alberti e Coll. (Res Chem Intermed, 2000). Un siero di controllo, a titolo noto, è stato utilizzato per la calibrazione, eseguita secondo le "CLIA regulatory guidelines". I coefficienti di variazione (CV) sono stati determinati analizzando 20 aliquote di siero, rispettivamente fresco per quello intraserie e congelato a -20°C per quello interserie. Per la valutazione del profilo lipidico sono stati usati kit dedicati.

Risultati. Alle prove di calibrazione, il d-ROMs test ha mostrato una variabilità accettabile, con un elevato coefficiente di correlazione ($r = 0.968$). I risultati sono apparsi lineari fra 60 e 450 U CARR, in sostanziale accordo con i dati della letteratura (50-500 U CARR). Il CV intraserie e quello interserie sono risultati, rispettivamente, 4.6% e 5.1%, leggermente al di sopra di quelli rilevati, su sistema analitico Hitachi 717, da Iamele e Coll. (Clin Chem Lab Med, 2002). Nel gruppo di studio, il valore medio +/- DS del d-ROMs test è stato 246.35 +/- 72.42 U CARR, lievemente al di sotto del range fisiologico, come atteso per chi pratica regolare attività fisica. Coerentemente nella norma il profilo lipidico (colesterolo totale 179.15 +/- 30.05 mg/dL; colesterolo HDL 54.50 +/- 11.13 mg/dL; colesterolo LDL 105.45 +/- 24.45 mg/dL; trigliceridi 77.15 +/- 30.76 mg/dL).

Discussione e conclusioni. Applicato ad un sistema analitico automatico, il d-ROMs test ha mostrato un livello accettabile sia di stabilità che di imprecisione analitica, confermandosi, applicato ad un gruppo di volontari fisicamente attivi, metodo semplice, rapido e riproducibile per la valutazione di routine dello stress ossidativo nei laboratori di chimica clinica.

EQUILIBRIO GLICO-METABOLICO E STRESS OSSIDATIVO IN PAZIENTI CON DIABETE TIPO II: STUDIO PRELIMINARE

F-04

Ciancaglini G.¹, Golato M.², Pupillo M.², De Luca A.², Di Sciascio C.¹, Di Cintio L.¹, Turchi C.³

¹ Patologia Clinica, ²Diabetologia P.O. Lanciano, ³Servizio Sanità Pubblica Asl-03

Scopo: lo stress ossidativo rappresenta un'alterazione dell'equilibrio tra processi ossidativi e riduttivi che si verificano nelle cellule con eccessiva produzione e/o incapacità di smaltire i radicali liberi prodotti. L'accumulo di radicali può determinare lesioni cellulari e tissutali, responsabili di patologie croniche o di condizioni sistemiche (invecchiamento) anche se non è possibile stabilire con certezza se l'accumulo rappresenta la causa o l'effetto delle lesioni. Lo stress ossidativo può rappresentare un fattore di rischio aggiuntivo in molte patologie come il cancro, le malattie dimetaboliche, l'arteriosclerosi e come tale da controllare attraverso integrazioni terapeutiche e/o cambiamenti di stile di vita. Scopo del lavoro è valutare l'importanza dello stress ossidativo nei pazienti con diabete tipo II, attraverso la determinazione dei radicali liberi dell'ossigeno(d-ROMs) correlati con parametri biochimici classici e complicanze micro e macrovascolari.

Materiali e metodi: su 275 pazienti con diabete di tipo II è stato valutato, in modo random, il valore dei d-ROMs a digiuno, nell'ambito del controllo diabetologico che prevede il monitoraggio degli indici di compenso glicometabolico e delle complicanze vascolari. La valutazione del controllo metabolico è stata effettuata tramite prelievo ematico eseguito a digiuno con dosaggio di: emoglobina glicata (Hb1Ac-HPLC-TOSOH) microalbuminuria, colesterolo, frazioni Hdl e Ldl, trigliceridi (metodi turbidimetrico ed enzimatico-Au600 Olympus) e d-ROMs (Diacron applicato su tecnologia Olympus-Au 400). Il valore di riferimento dei d-ROMs, espresso in Caratelli units test (U Carr) è indicato dalla ditta tra 250 e 300 U Carr. Il nostro gruppo di controllo composto da 50 donatori di sangue ha mostrato una media (\pm DS) di 260 U Carr \pm 25. I risultati dei d-ROMs ottenuti sono stati elaborati statisticamente con il t di Student, confrontandoli con le complicanze vascolari, l'età, il sesso, la durata del diabete e con gli altri parametri di laboratorio.

Risultati e conclusioni: il risultato dei d-ROMs è stato correlato con Hb1Ac (<8%>8% p 0,96), Microalbuminuria (p 0,28), Ipertensione (p 0,20), Retinopatia -Fundus oculi (p 0,24), Macroangiopatia (p 0,79), Dislipidemia (p 0,64), Durata del diabete (<10 aa >10 aa p 0,76), Età (<65aa >65 aa p 0,86) Sesso (M/F p 0,36). I dati preliminari espressi dalla nostra popolazione non indicano correlazioni significative con i parametri confrontati. Lo studio proseguirà sia per ampliare la casistica che per la valutazione delle variazioni infradiana (a digiuno e postprandiale) e nello scompenso metabolico acuto e cronico, al fine di definire il ruolo dei d-ROMs come marker da affiancare ai tradizionali parametri nella pratica clinica.

UN ALGORITMO DIAGNOSTICO PER LO STRESS OSSIDATIVO

F-05

Iorio E.L.*, Cinquanta L.#, Pisano R.°

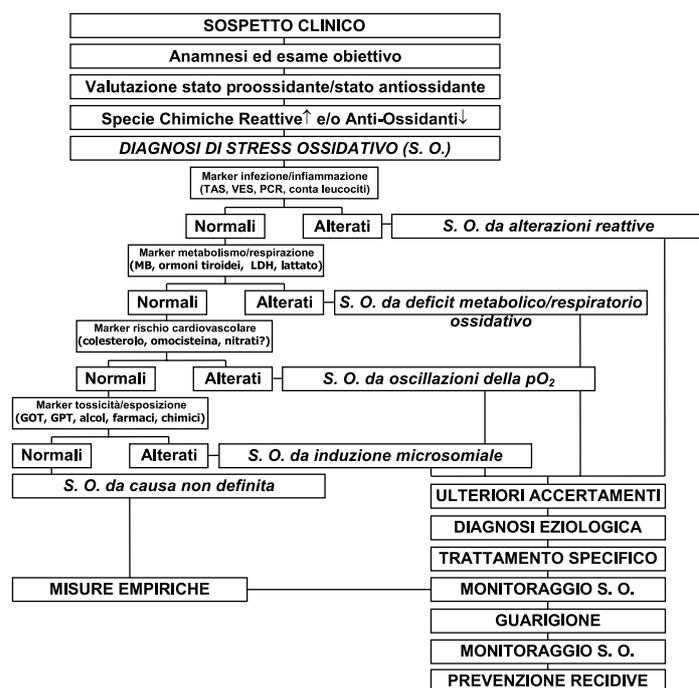
*Osservatorio Internazionale Stress Ossidativo. Parma; #Lab. Patologia Clinica Az. Osp. S. Giovanni di Dio e Ruggi D' Aragona Salerno; °Lab. Patologia Clinica PO Oliveto Citra ASL SA2

Scopo del lavoro. Definire un algoritmo per la diagnosi di laboratorio di stress ossidativo, condizione risultante da uno squilibrio fra produzione ed eliminazione di specie chimiche reattive e ritenuta responsabile dell'invecchiamento precoce e di molte patologie (aterosclerosi, morbo di Parkinson, diabete mellito, cancro, etc.).

Materiali e metodi. Applicazione dell'algoritmo, ottenuto dal confronto tra letteratura scientifica (MEDLINE) ed esperienza clinica, ad un gruppo di pazienti (n=20) a rischio di stress ossidativo.

Risultati. Dalla valutazione delle performance analitiche di 24 test, fra cui il d-ROMs test (Diacron International, Grosseto), già in uso nella pratica clinica, è stato ricavato un algoritmo diagnostico, basato sulla definizione analitica e sulla classificazione patogenetica dello stress ossidativo:

Discussione e conclusioni. L'originale algoritmo, in corso di ulteriore validazione, appare potenzialmente utile nella pratica clinica in quanto consente, tra l'altro, di formulare una diagnosi eziologica di stress ossidativo e di gestire gli eventuali trattamenti specifici e/o antiossidanti.



DATI PRELIMINARI SULL'ADATTAMENTO NEUROENDOCRINO IN UNO SPELEOSUB DURANTE UNA ESPLORAZIONE AD ALTO RISCHIO IN UN SIFONE IPOGEO SITO A -700M

F-06

Gianoli E.**, **Stenner E.***, **Piccinini C.****, **Biasioli B.****

*Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica, Università di Padova **Dipartimento di Medicina di Laboratorio - Azienda Ospedaliera Universitaria, Trieste

Scopo del lavoro. La speleosubacquea viene unanimemente considerata lo sport più pericoloso nell'ambito degli sport estremi di montagna per le sue caratteristiche di altitudine, basse temperature, limitata visibilità ed assoluto isolamento. Proprio per queste particolari condizioni ambientali e per la forte pressione psicologica a cui viene sottoposto lo speleosubacqueo, abbiamo deciso di indagare con quali modificazioni ormonali e di quale entità, si realizzi un'eventuale sindrome di adattamento. Abbiamo monitorato la funzionalità di alcuni tra i principali organi coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi dell'organismo: l'ipofisi, tramite il dosaggio di GHG, l'asse ipofisario-tiroideo tramite il dosaggio di TSH, fT3 e fT4 e la corticosurrene con il dosaggio della cortisolemia.

Materiali e metodi. Il soggetto (43 anni, peso: 78 Kg, altezza: 182cm) preso in esame è un subacqueo d'élite (numerose immersioni in mare aperto, nei laghi alpini e nei sifoni sotterranei, quasi sempre in solitaria), in un buono stato di salute. Per l'immersione sono state utilizzate una muta stagna e 2 bombole da 7l con miscela NITROX (30% ossigeno e 70% azoto). L'esperienza, per verificare i dati ottenuti, è stata eseguita due volte e nelle medesime condizioni. I prelievi sono stati effettuati prima e dopo l'immersione (durata 46 min) ed all'uscita della cavità (8 ore dopo); le provette, trasportate in un recipiente rigido a tenuta termica, sono state centrifugate all'uscita della grotta e, grazie all'elitransporto, trasportate in laboratorio entro 2 ore. Sono stati eseguiti i seguenti dosaggi su siero: TSH, fT3, fT4, cortisolo in chemiluminescenza su DXI BECKMAN COULTER, GHG in chemiluminescenza su LIAISON DiaSorin.

Risultati. Rispetto ai valori basali nel soggetto esaminato si osserva un aumento dei livelli sierici di TSH (post sifone: +27,85%, uscita: +36,53%) associato a evidenti modificazioni degli ormoni tiroidei: fT3 (post sifone: -6%, uscita: +18,2%) e fT4 (post sifone -11,2%, uscita: +32,5%). Si rileva, inoltre, una variazione del cortisolo (post sifone: +18,65%, uscita: -9,6%) e di GHG (post sifone: +5900%, uscita: +4900%).

Discussione e Conclusioni. I dati in nostro possesso evidenziano che le condizioni estreme di impegno psicofisico nonché le peculiari caratteristiche ambientali costituiscono agenti stressanti di entità tale da alterarne l'omeostasi: l'organismo risponde realizzando un nuovo equilibrio dei sistemi neuro-ormonali, capace di fronteggiare adeguatamente la maggior richiesta di ossigeno e di energia indotta dalle emozioni e dalla fatica muscolare.

DANNO MUSCOLARE ED EMOLISI INTRAVASALE DURANTE UNA ESPLORAZIONE IPOGEO AD ALTA DIFFICOLTÀ

F-07

Stenner E.*, **Gianoli E.****, **Piccinini C.****, **Biasioli B.****

*Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica, Università di Padova **Dipartimento di Medicina di Laboratorio - Azienda Ospedaliera Universitaria, Trieste

Scopo del lavoro. L'esercizio fisico, in particolare se intenso o di lunga durata, induce lesioni delle fibre muscolari la cui gravità dipende dalla durata e dalle caratteristiche dell'esercizio e dallo stato di allenamento del soggetto. La speleologia alpina si svolge in un ambiente estremo ed è uno sport d'endurance di lunga durata caratterizzato da uno sforzo muscolare intenso ed esaustivo unito ad un costante impatto di ampie parti del corpo contro la roccia, in particolare durante la progressione nei meandri e nelle strettoie. Tali peculiarità ci hanno indotto a verificare, utilizzando gli usuali markers di sofferenza muscolare come la creatin chinasi (CK) e la lattico deidrogenasi (LDH) e marker di emolisi intravasale come l'aptoglobina, se vi siano o meno dei danni a livello muscolare e/o intravasale durante una esplorazione ipogea di lunga durata.

Materiali e Metodi. Sono stati scelti 5 speleologi, 4 esperti ed 1 amatoriale, in un buono stato di salute. La sperimentazione si è svolta in una grotta alpina con inizio alle ore 14 e conclusione alle ore 8 della mattina seguente. I prelievi del sangue sono stati eseguiti con il seguente protocollo: -4 giorni prima della esplorazione, ore 7.30, con tempi di processazione simili al giorno della sperimentazione; -la mattina della sperimentazione, ore 7.30; -in grotta, dopo 1h 40' (-200m); -dopo 5 ore, sul fondo della grotta a -700m; -dopo circa 18 ore, in uscita; -la mattina successiva, ore 7.30. All'uscita le provette da siero sono state centrifugate e, grazie all'elitransporto, recapitate entro 2 ore presso il Laboratorio. I parametri esaminati sono: CK, LDH (OLYMPUS 5400) e aptoglobina (nefelometria-Dade Behring-).

Risultati. In tutti gli speleo si è verificato un iniziale moderato aumento dei livelli sierici di CK ed LDH che è divenuto significativo già al termine della discesa, a -700m; il picco massimo, invece, (aumento medio rispetto i valori basali- CK:2086% e LDH:139.34%) si è misurato al termine della risalita. I livelli sierici di aptoglobina (variabilità biologica: 23%), rilevati solo su 3 soggetti, sono scesi in modo continuativo durante la permanenza ipogea con picco minimo (calo medio: 46,6%) all'uscita della cavità. Il soggetto meno esperto ha evidenziato, per tutti i parametri esaminati, le modificazioni più marcate.

Discussione e Conclusioni. L'analisi dei dati in nostro possesso suggerisce che la speleologia è uno sport di lunga durata particolarmente intenso ed a forte impatto tale da indurre sia distruzione del muscolo scheletrico (esercizio fisico e numerosi impatti) sia emolisi intravasale, entrambi fenomeni più marcati durante la risalita.

VALUTAZIONE A LUNGO TERMINE DEL PEPTIDE NATRIRETICO DI TIPO B (BNP) NEL PLASMA CONGELATO

F-08

***Daves M., Cemin R., *Negrisolo S., *Cosio G., *Rizza F.**

*Laboratorio di Biochimica Clinica, Divisione di Cardiologia, Azienda Sanitaria di Bolzano

Scopo del lavoro: è stata valutata la stabilità a lungo termine (30 giorni) del BNP nel plasma.

Materiali e metodi: il metodo da noi utilizzato è il Triage BNP Test Biosite, un immunodosaggio enzimatico a due siti predisposto per l'uso con gli Immunoassay Systems Beckman Coulter (Access 2). Abbiamo raccolto 30 campioni di sangue in provetta con EDTA. I campioni sono stati centrifugati a 3500 giri/minuto e il plasma aliquotato in due distinte provette. La prima è stata utilizzata per l'iniziale determinazione eseguita entro 30 minuti dal prelievo. La seconda è stata congelata a -20°C per 30 giorni senza aggiunta di inibitori delle proteasi; quindi si è nuovamente eseguito il dosaggio entro 30 minuti dallo scongelamento. Dai risultati ottenuti abbiamo determinato il coefficiente di correlazione (r), la retta di regressione di Passing-Bablok e il plot di Bland-Altman.

Risultati: Per quanto riguarda la stabilità dell'analita dopo 30 giorni di conservazione a -20°C e in assenza di inibitore delle proteasi, abbiamo ottenuto i seguenti risultati: $r = -0.995$; equazione di regressione secondo Passing-Bablok $Y = 1.000 + 1.000 X$, intercetta 1.000 (95% CI: da -0.823 a 4.875), slope 1.000 (95% CI da 0.932 a 1.029); il Bland-Altman mostra una differenza percentuale della media di 1.9 (+1.96 SD: 15.5; -1.96 SD: -11.8).

Discussione e conclusioni: dall'analisi dei dati ottenuti possiamo concludere che la concentrazione del BNP nel plasma EDTA congelato mantenuto a -20°C appare rimanere stabile almeno trenta giorni, anche in assenza di inibitori delle proteasi.

VALUTAZIONE DELLA IMPRECISIONE ANALITICA NELLA SERIE E TRA LE SERIE NELLA DETERMINAZIONE DEL PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B (BNP)

F-09

Daves M., *Cemin R., Cosio G., Negrisolo S., Scala S., Rizza F.

Laboratorio di Biochimica Clinica, *Divisione di Cardiologia, Azienda Sanitaria di Bolzano

Scopo del lavoro: il BNP è stato proposto come marcatore biochimico in grado di fornire un mezzo per la valutazione e il monitoraggio dei pazienti affetti da insufficienza cardiaca. Sono state valutate alcune caratteristiche di affidabilità: l'imprecisione analitica nella serie e tra le serie.

Materiali e metodi: il metodo da noi utilizzato è il Triage BNP Test Biosite, un immunodosaggio enzimatico a due siti ("sandwich") predisposto per l'uso con gli Immunoassay Systems Beckman Coulter. Per calcolare l'imprecisione analitica nella serie abbiamo analizzato in duplicato in condizioni di routine e nel corso di una stessa serie di analisi 30 campioni di plasma EDTA, ottenuti da donatori. I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 3500 giri al minuto e analizzati entro 30 minuti dal prelievo. A partire dai risultati ottenuti abbiamo calcolato le medie dei due gruppi di letture, le differenze fra i risultati di ciascuna coppia, la media generale, la deviazione standard (DS) entro la serie. L'imprecisione analitica tra le serie è stata calcolata mediante l'utilizzo di campioni di controllo provenienti da uno stesso lotto (Triage BNP CQ Biosite). Dopo aver raccolto 20 risultati abbiamo determinato la media, la deviazione standard e il coefficiente di variazione fra le serie. Tutte le determinazioni sono state effettuate con l'analizzatore Access 2 (Beckmann Coulter).

Risultati: i valori ottenuti sono compresi tra un valore minimo di 18 pg/ml e un valore massimo di 121 pg/ml, con una media generale di 56,12 pg/ml. Dall'analisi dei dati ottenuti risulta che l'imprecisione nella serie espressa come DS è di 5,16 pg/ml e il CV del 9%. Per quanto riguarda l'imprecisione tra le serie abbiamo ottenuto un valore di DS di 6,55 pg/ml ed un CV dell'8%.

Discussione e conclusioni: dall'analisi dei dati ottenuti emerge che per quanto riguarda l'imprecisione analitica, questa risulta soddisfacente. E' accettato che l'imprecisione analitica di un test per non influenzare in maniera significativa il suo uso clinico non deve superare la metà del CV biologico intraindividuale. Dai dati riportati in letteratura emerge che il BNP è caratterizzato da una elevata variabilità biologica (CV>30%), quindi possiamo concludere che per il dosaggio del BNP possiamo avvalerci di un ottimo sistema analitico.

EFFETTI A BREVE TERMINE SUL PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B DI UNA TERAPIA A BASSO DOSAGGIO DI CARVEDILOLO IN PAZIENTI CON GRAVE DISFUNZIONE VENTRICOLARE SINISTRA

F-10

Lazzerini S., Minneci C.*, Martelli C., Verdelli M.*, Sarti A.*, Doni L.

Laboratorio Chimica Clinica - *Ambulatorio Scompenso Cardiaco; Nuovo Ospedale San Giovanni di Dio, Via di Torregalli 3, 50143 Firenze

Scopo del Lavoro: I livelli plasmatici del Peptide Natriuretico di tipo B (BNP) sono correlati con il grado di disfunzione ventricolare sinistra (LVD) e con la prognosi nei pazienti con scompenso cardiaco cronico (CHF). E' stato recentemente dimostrato che la terapia con beta-bloccanti (BB) riduce la mortalità e le ospedalizzazioni in tali pazienti; il beneficio appare evidente anche con bassi dosaggi di BB, ma non è ancora chiaro l'effetto sui livelli di BNP. Abbiamo così cercato di verificare gli effetti di basse dosi di carvedilolo (BB) sull'equilibrio neuroormonale dei pazienti con grave LVD.

Materiali e metodi: Abbiamo selezionato tra 172 pazienti con severa LVD (EF < 0.30) quelli con 2 o più valutazioni del BNP (ADVIA Centaur, Bayer) dopo l'inizio della terapia con carvedilolo, trattati con la dose più alta tollerata di inibitori del recettore dell'angiotensina in accordo con le recenti linee-guida europee sul trattamento del CHF. Abbiamo eseguito un follow up di 6 mesi a 15 pazienti, tutti euolemici e senza alcuna variazione del dosaggio diuretico durante il periodo di osservazione (13 M e 2 F, età media 69 anni). L'eziologia era: ischemica in 9 pazienti, primitiva in 4, ipertensiva in 2. Dodici pazienti erano in classe NYHA II, 3 in classe NYHA III. Il carvedilolo è stato somministrato iniziando dalla dose di 3,125 mg due volte al giorno e titolato fino al massimo dosaggio tollerato in accordo con le linee-guida. I pazienti che hanno sospeso il trattamento sono stati ugualmente seguiti in follow up ed hanno eseguito il dosaggio del BNP.

Risultati: Dodici pazienti hanno mostrato una riduzione dei livelli di BNP sin dopo l'inizio del trattamento (media: 3 settimane). Tre pazienti hanno sospeso il trattamento per peggioramento dello scompenso cardiaco (un caso) e per scarsa compliance (2 casi). Questi pazienti hanno mostrato un aumento dei livelli di BNP. Durante il follow up la EF, i diametri, i volumi ventricolari e la classe funzionale NYHA sono rimasti invariati.

Discussione e Conclusioni: I nostri dati preliminari dimostrano l'efficacia di bassi dosaggi di carvedilolo nel migliorare lo stato neuroormonale dei pazienti con grave LVD, nonostante i parametri clinici ed ecocardiografici rimangano invariati. Il BNP potrebbe essere il parametro che seleziona quei pazienti apparentemente stabili che potrebbero avere prognosi peggiore. Inoltre le variazioni positive dello stato neuroormonale potrebbero indicare un ulteriore meccanismo per spiegare gli effetti benefici del carvedilolo anche a bassi dosaggi terapeutici in pazienti con CHF e severa LVD.

PROPOSTA DI UN APPROCCIO GRADUALE DEL MEDICO CURANTE NELLE DIAGNOSI E FOLLOW UP DELLE INFEZIONI STREPTOCOCCICHE

F-11

Mangraviti S.^a, Bandettini R.^b, Cozzani R.^a, Facco F.^a, Pescetto L.^b, Ricagni L.^b, Melioli G.

Laboratorio Centrale di Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche. IRCCS "G. Gaslini", "Modulo Funzionale di Chimica-Clinica. ^bSezione di Microbiologia

Scopo del lavoro. Si è scelto di studiare le infezioni da Streptococco β emolitico di gruppo A (SGA) perché di grande rilevanza sociale per le possibili complicanze invalidanti quali la glomerulonefrite acuta con insufficienza renale e la malattia reumatica con endocardite. Si è valutato l'approccio metodologico alle infezioni da SGA e le relative tariffe in pazienti randomizzati.

Materiali e Metodi. Su 1.448 soggetti si sono studiati i test comunemente utilizzati per la diagnosi di infezione da SGA e si è analizzato un campione di 50 pazienti con impetigine. Si sono quindi valutate le relative tariffe esaminando i seguenti test: colture di essudato faringeo (TF), nasale (TN) o cutaneo (TC), Anticorpi anti-Streptolisina O streptococcica (TASLO), Anticorpi anti-Dnasi B streptococcica (ADNasi B), Proteina C reattiva (PCR), Leucociti (GB) e Creatina (Crea). Rilevanti TASLO e ADNasi B: infatti la Streptolisina O, cioè ossigeno-labile in quanto inattivata dall'ossigeno, è responsabile dell'attività emolitica e tossica per vari tipi di cellule tra cui soprattutto quelle miocardiche mentre l'esoenzima desossiribonucleasi B o Dnasi o Streptodornasi ha la capacità di depolimerizzare il DNA che si accumula nel pus in seguito alla disintegrazione dei leucociti, facendone aumentare la viscosità.

Risultati. Lo studio è stato realizzato mediante analisi globale e specifica dei singoli analiti con statistiche elementari e test t di Student. Le frequenze percentuali di positività di ADNasi B e PCR, analizzate mediante il test del χ^2 , hanno evidenziato rispettivamente $p < 0,01$ e $p < 0,05$. Dalle valutazioni effettuate sui 1.448 soggetti studiati si possono sinteticamente evidenziare i seguenti rilievi tariffari totali in €: TASL 21.612 - ADNasi B 8.529 - TF,TN,TC 13.113. Nel contempo, i dati relativi ai 50 pazienti con impetigine evidenziano: TASL 135 - ADNasi B 153 - TF,TN,TC 37. PCR e GB non risultano discriminanti quanto la ADNasi B che rappresenta un indicatore di infezione da SGA risultando patologica in tutti i casi di isolamento culturale di SGA.

Discussione e Conclusioni. Gli anticorpi anti-Streptolisina O e anti-Dnasi B costituiscono indubbiamente efficaci mezzi diagnostici e di monitoraggio consentendo un efficace controllo delle patologie correlate a SGA con rapido reinserimento lavorativo e basso rischio di complicanze. Nelle infezioni cutanee si verifica raramente aumento del TASLO mentre aumentano gli anticorpi anti-Dnasi B cui è utile associare subito la coltura. Questo iter diagnostico, se applicato ai 1.448 casi del nostro studio corrisponde a tariffe di € 8.529 invece di € 24.818.

DISTRIBUZIONE DEI LIPIDI SIERICI CORRELATA A SESSO ED ETÀ IN UNA AMPIA POPOLAZIONE SANA DI DONATORI DI SANGUE

F-12

Di Serio F., Specchia I., Pansini N.

Patologia Clinica I, Policlinico di Bari

Scopo del lavoro. Linee guida e raccomandazioni sono state pubblicate sull'importanza del controllo dei lipidi sierici in quanto fattori di rischio di malattie coronariche. L'influenza del sesso ed età, nelle concentrazioni dei lipidi sierici è stata da noi valutata in un'ampia popolazione di soggetti sani.

Materiali e Metodi. CT, C-HDL, C-LDL, TG sono stati dosati, su Dimension RxL, in 450 donatori di sangue: femmine (F) = 176, maschi (M) = 274; età media (DS) = 40(12) anni. I dati sono stati suddivisi per sesso ed in tre gruppi di età: gruppo A (20-40 anni), gruppo B (41-60 anni), gruppo C (>60 anni) ed analizzati con ANOVA dopo trasformazione logaritmica.

Risultati. Intervalli di riferimento (2.5 e 97.5 percentile) e mediane (95% IC) suddivisi per sesso, erano i seguenti: CT (F): 129-272 mg/dl, mediana = 196 (190-200) mg/dl; CT (M): 127-266 mg/dl, mediana = 187(182-193) mg/dl. C-HDL (F): 34-91 mg/dl, mediana = 57 (55-60) mg/dl; C-HDL (M): 25-71 mg/dl, mediana = 44 (41-46) mg/dl. C-LDL (F): 59-187 mg/dl, mediana = 120 (120-126) mg/dl; C-LDL (M): 73-181 mg/dl, mediana = 124 (120-130) mg/dl. TG (F): 26-187 mg/dl, mediana = 66 (59-71) mg/dl; TG (M): 32-254 mg/dl, mediana = 81 (72-92) mg/dl. Le differenze delle concentrazioni di C-HDL e TG nei due sessi erano statisticamente significative ($p < 0.0001$). In soggetti di età compresa tra 41-60 anni le concentrazioni di C-LDL e CT erano statisticamente più alte ($p < 0.0001$) rispetto a quelle determinate in soggetti appartenenti agli altri due gruppi di età.

Conclusioni: Il Terzo Adult Treatment Panel Report (ATPIII) ha cambiato i cut-off decisionali per C-LDL (100 mg/dl), C-HDL (40 mg/dl) e TG (200 mg/dl), mentre ha lasciato invariato quello del CT (200 mg/dl). I nostri dati suggeriscono che dieta e stile di vita devono essere modificati al fine di ridurre il rischio di malattie cardiovascolari.

VARIABILITÀ INTRAINDIVIDUALE GIORNALIERA DI NT-proBNP: OSSERVAZIONI IN PAZIENTI CON SCOMPENSO CARDIACO CRONICO IN FASE STABILE

F-13

Cocco C.¹, Lo Cascio C.¹, Bertolani M.¹, Soldati M.¹, Zanolla L.², Rizzotti P.¹

¹ Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, OCM, Verona

² Divisione Clinicizzata di Cardiologia, Università degli Studi di Verona, Verona

Introduzione. Nell'ambito di un protocollo di studio sulla variabilità biologica intraindividuale di NT-proBNP in pazienti con scompenso cardiaco stabile in trattamento, si è voluto osservare l'entità del CVi giornaliero.

Materiali e Metodi. Lo studio ha riguardato 9 pazienti (8 maschi e 1 femmina, età 50-78 anni), con frazione di eiezione ventricolare sinistra inferiore al 45% e in regime farmacologico standard, ricoverati per impianto elettivo di pacemaker o defibrillatore. Per ciascun paziente, prima dell'intervento, sono stati raccolti 5 campioni di plasma eparinato alle ore 8, 13, 16, 22 e alle ore 6 del giorno successivo. I campioni sono stati aliquotati entro due ore dal prelievo e conservati a -80 °C fino alla determinazione di NT-proBNP, effettuata in duplicato in un'unica serie con reattivo dedicato (PBNP) sull'analizzatore Dimension RxL Max (DadeBehring).

Risultati. La media e la mediana di NT-proBNP in questo gruppo di pazienti sono rispettivamente 2234 ng/L e 697 ng/L (valori da 96 a 11673 ng/L), i coefficienti di variazione analitico, biologico e totale ottenuti sono i seguenti: CVa % 4.30 (3.0-5.4), CVi % 19.3 (7.0-28.9), CVt % 19.45 (8.43-29.2). Le variazioni medie dei singoli punti rispetto al valore medio dell'analisi nel soggetto sono: h 8.00 -2%, h 13.00 + 6%, h 16.00 + 7%, h 22.00 -6%, h 6.00 -7%. La differenza tra due punti successivi non è risultata significativa.

Discussione e Conclusioni. L'imprecisione analitica soddisfa ampiamente le specifiche di qualità basate sulla variabilità biologica ($CVa < 0.5 CVi$). Il CVi giornaliero ottenuto (19.3%) è risultato più ampio dell'atteso sulla base di lavori precedenti, forse per l'inclusione nel presente studio del periodo notturno, sempre comunque inferiore alla variabilità intraindividuale complessiva riportata in letteratura. Per quanto riguarda l'individuazione di un ritmo circadiano, pur osservandosi un aumento dei valori tra le ore 8 e le ore 16 (+9% rispetto alla media) e un decremento nel periodo seguente (-14%), la differenza tra dati successivi nelle diverse ore del giorno o tra valore minimo e valore massimo non è risultata significativa, forse a causa delle dimensioni del campione statistico oppure per gli intervalli di tempo che sono stati scelti. Da questi dati, pertanto, non sembra da ritenersi rilevante l'orario del prelievo per l'inquadramento clinico di un paziente, anche se la presenza di un accenno di ritmo suggerirebbe, particolarmente in caso di follow-up terapeutico, una standardizzazione del momento del campionamento.

CISTATINA C NEL LIQUIDO AMNIOTICO: DATI PRELIMINARI**F-14****Maida C.*, Bruno F.*, Cataldi P.*, Agostinelli C.*, Carrera F.***, Ruggeri M.***

*Dipartimento di Patologia Clinica AO S.Giovanni-Addolorata Roma, *** DH ostetrico AO S.Giovanni-Addolorata Roma

Scopo del lavoro. La cistatina C è una proteina basica non glicosilata, prodotta dalla maggior parte dei tessuti, liberamente filtrata dal glomerulo e catabolizzata nel tubulo contorto prossimale (nè riassorbita né secreta), usata come marcatore biochimico endogeno di filtrazione glomerulare. La cistatina C può essere facilmente misurata nel sangue e nei liquidi biologici. Per quanto riguarda il suo uso nella diagnosi prenatale si è visto che la cistatina C presente nel liquido amniotico deriva esclusivamente dall'urina fetale ed il suo aumento è correlabile al suo ridotto catabolismo. Studi effettuati al riguardo hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i livelli di cistatina C nel liquido amniotico di gravide senza complicanze rispetto a quelle con complicanze ed ancora con quelle in cui il feto presentava una uropatia ostruttiva, avvalorandone l'importanza nella definizione della funzione renale tubulare fetale ed evidenziando il valore predittivo per l'identificazione di feti con uropatia ostruttiva. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la correlazione fra cistatina C nel liquido amniotico e parto prematuro.

Materiali e metodi. Sono state studiate 308 pazienti che fra il 2003 e il 2005 si sono recate presso il DH ostetrico dell'Ospedale S.Giovanni per sottoporsi ad amniocentesi. L'età gestazionale era 16-18 settimane con gravidanza in normale evoluzione e con valore quantitativamente normale del liquido amniotico. Sul liquido amniotico veniva effettuato il dosaggio della cistatina C (immunonefelometria) e dell'alfafetoproteina (chemiluminescenza). Delle 86 pazienti che hanno poi partorito presso la nostra struttura è stata vista la settimana di nascita ed il peso del bambino alla nascita.

Risultati. Il valore medio di cistatina C riscontrato sulle 308 pazienti era di 1,387 mg/L (SD 0,322). L'analisi statistica effettuata sulle 86 pazienti ha evidenziato che i risultati delle concentrazioni di cistatina C nei liquidi amniotici sono distribuiti normalmente. Vi è una correlazione negativa che, nei dati finora raccolti non raggiunge la significatività, tra peso alla nascita e valore di cistatina C nel liquido amniotico; non vi è correlazione tra settimana di nascita e valore di cistatina C. I valori di cistatina C sono più alti nei neonati sottopeso (<2500 g), ma questo dato non raggiunge la significatività.

Conclusioni. I dati raccolti sinora ci portano a spostare la nostra attenzione piuttosto che verso la prematurità verso quelle problematiche strettamente inerenti al feto; in particolare abbiamo notato una correlazione tra valori di cistatina C e peso del feto alla nascita.

CORRELATION BETWEEN FASTING PLASMA HOMOCYSTEINE LEVELS AND VARIOUS COMPONENTS OF THE METABOLIC SYNDROME IN OBESE WOMEN**F-15****Ruocco L.*, Pellegrini G. *, Mammoli C.***, Pelosini C.***, Fortunato D.***, Giannetti M.***, Pucci A.***, Marsili A.***, Scartabelli G.***, Rocco V.***, Fierabracci P.***, Pavia T. *, Manganiello M. *, Santini F.***, Pinchera A.*****

*U.O. Clinic Laboratory, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa

**Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa

Aim of the study: Homocysteine is a nonprotein-forming amino acid produced by demethylation of methionine. Cobalamin, pyridoxine e folate are essential cofactors for these reactions. Elevated plasma homocysteine levels are considered a risk factor for cardiovascular disease. High plasma homocysteine levels are usually caused by genetic defects of the enzymes involved in homocysteine metabolism or by nutritional deficiencies in vitamin cofactors. Other causes of hyperhomocysteinemia include hypothyroidism, neoplasias and cigarette smoking. A positive association has been found between concentrations of plasma homocysteine and uric acid or creatinine, which may be related to impaired metabolism or to reduced excretion. There are conflicting reports in the literature on the relationship between plasma fasting homocysteine levels and the metabolic syndrome, a cluster of cardiovascular risk factors associated to visceral obesity and insulin-resistance. Aim of this study was to evaluate the relationship between fasting plasma homocysteine levels and various parameters of the metabolic syndrome.

Materials and methods: Twenty adult obese women (8 with metabolic syndrome) aged 20 to 67 years (mean \pm SD = 40,76 \pm 11,6), weight ranging from 82,5 to 174 Kg (117,2 \pm 20,9) and body mass index (BMI) ranging from 35,2 to 65,69 Kg/m² (45,1 \pm 7,4) were enrolled. Fasting blood samples were drawn for the measurement of: plasma homocysteine, glucose, HDL cholesterol, triglycerides, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gammaGT, uric acid, creatinine, insulin, HOMA, folate and cobalamin. Weight, height, BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure were measured.

Results: The homocysteine mean value was 8,96 \pm 2,51 micromol/L (normal value <13). There was no difference between patients with or without metabolic syndrome.

A direct correlation between plasma homocysteine and uric acid (p=0,033; R=0,477) or creatinine (p=0,037; R=0,481) was observed, while no association could be demonstrated between plasma homocysteine and the other parameters studied.

Discussion: The results of this study, although in a limited number of subjects, indicate that: i) the metabolic syndrome in obese women is not associated with increased levels of fasting plasma homocysteine; ii) insulin-resistance, if involved in the regulation of fasting plasma homocysteine, plays a minor role as compared with other factors (e.g. renal excretion).

ACIDO LATTICO IN POCT DA PRELIEVO CAPILLARE: VALUTAZIONE ANALITICA E PREANALITICA DEL SISTEMA ABT-LACTATPROFI 3000

F-16

Mezzena G., Consolaro S., Stocchero M., Giavarina D.

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia – Ospedale S. Bortolo, Vicenza

Scopo del Lavoro. La valutazione dei livelli di acido lattico al letto del paziente è utile per alcune condizioni di urgenza terapeutica. La possibilità di prelievo capillare risulta interessante per il risparmio di campione da prelevare e per pazienti con accessi venosi difficili. Scopo di questo lavoro è valutare le performances dello strumento ABT-Lactatprofi 3000.

Materiali e Metodi. Sono state eseguite 25 determinazioni di Acido Lattico su ABT Lactatprofi 3000 (Cremascoli&Iris, Milano) da prelievo capillare, ottenuta da 25 volontari (staff). Un campione di sangue in provetta con fluoruro di potassio (Becton Dickinson,) è stato raccolto immediatamente dopo il prelievo capillare, per i test di confronto: ripetizione su sangue intero e su plasma con ATB e misura su plasma con autoanalizzatore Dimension RXL (Diamond Diagnostics, Holliston, MA, USA; Lactic Acid Flex® reagent cartridge).

Risultati. Bias tra sangue intero su ABT e plasma su Dimension RXL: 0.12 mMol/L (95% CI 0,05 a 0,18 mMol/L); concordanza tra -0,2 e 0,4 mMol/L. Bias tra sangue capillare su ABT e plasma su Dimension RXL: 1,5 mMol/L (95% CI 0,90 a 2,05mMol/L); concordanza tra -1.2 e 4,2 mMol/L. (Figura).

Conclusioni. Il sistema ABT presenta ottime performances analitiche, comparate con i risultati ottenuti con RXL, sia su sangue intero che su plasma. Un rilevante problema preanalitico di pone per i prelievi su capillare, con bias molto ampi e non costanti. Questi dati depongono per la inaccettabilità del campione capillare per questo tipo di determinazione.

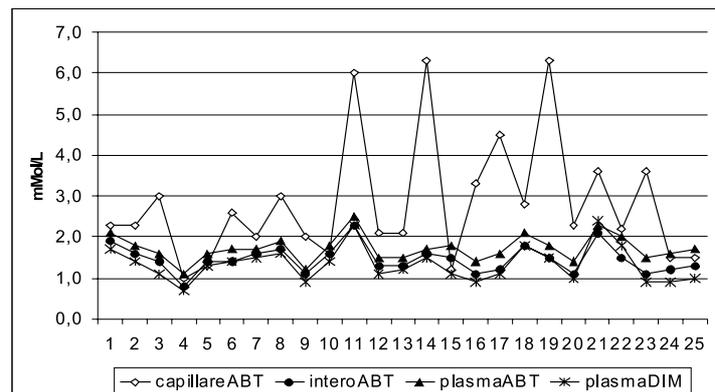


Figura. Risultati delle 25 determinazioni, nell'ordine di esecuzione. PlasmaDIM: sistema di riferimento Dimension RXL

ECG DA SFORZO E FAMILIARITÀ PER DIABETE MELLITO TIPO 1: ABNORME RISPOSTA PRESSORIA ALL'ESERCIZIO NELLE FAMIGLIE DEI PAZIENTI CON DIABETE MELLITO TIPO 1

F-17

Turini P., Rossi L., Friso A., Bani F., Bianchi E., Tedesco I., Baroni M., Pierini S., Deri D., Birindelli S.,[°] Matteucci E,[°] Rosada J.,[°] Pallini M.,[°] Evangelista I.,[°] Giusti C.,[°] Giampietro O.,[°] Innocenti B.

[°]Dip Med Interna, Università di Pisa, Lab Analisi 1, Az Osp Univ Pisana

Scopi dello studio. Confrontare test elettrocardiografico da sforzo delle famiglie T1DM vs soggetti sani di controllo senza familiarità diabetica; analizzare relazioni tra risposta al test ergometrico e presenza di fattori di rischio cardiovascolare, tradizionali e non. Parenti primo grado dei diabetici di tipo 1 (T1DM): elevati livelli dei biomarcatori di danno ossidativo

Materiali e Metodi. 35 T1DM (età 37±11 anni; durata malattia 18±11 anni; 9 con retinopatia, 9 con nefropatia diabetica), 74 parenti di primo grado di T1DM (48±12 anni), e 95 soggetti di controllo (44±13 anni), senza coronaropatia nota, che hanno eseguito test da sforzo (ETT) al cicloergometro. Anamnesi clinica e valutazione del rischio cardiovascolare (peso corporeo, pressione arteriosa, tabagismo, attività fisica abituale, glicemia a digiuno o FPG, insulinemia a digiuno o FPI, HbA1c, lipidi plasmatici, proteina C reattiva, fibrinogeno, folati, omocisteina, escrezione urinaria di albumina o UAER, tioli plasmatici o PSH (biomarcatori di ossidazione proteica))

Risultati. T1DM: livelli elevati di FPG, HbA1c, UAER, e folati, e livelli ridotti di PSH e omocisteina rispetto ai controlli. Parenti: differivano dai controlli per > concentrazione plasmatica di colesterolo e UAER, < livello circolante di PSH. Nessun soggetto ha presentato angina da sforzo. I T1DM raggiungevano valori maggiori di pressione sistolica (SBP) massimale nonostante una durata del test da sforzo minore. La SBP rimaneva elevata al 2° e 4° minuto del recupero. I parenti avevano > SBP durante esercizio a parità di carico di lavoro. Associati ad eccessiva risposta pressoria all'esercizio: pressione diastolica a riposo e HbA1c nella popolazione totale; durata malattia, tioli plasmatici e fibrinogeno nella popolazione diabetica; età, BMI tempo dedicato alle faccende domestiche nei parenti. BMI, fibrinogeno, e ExSBP/W (incremento di SBP indotto dall'esercizio normalizzato per il carico di lavoro massimale) aumentavano significativamente con la presenza di complicanze microangiopatiche nel probando, valori maggiori essendo riscontrabili nel sottogruppo dei parenti di pazienti nefropatici. Parenti: analisi regressione multipla individuava colesterolo LDL, BMI, attività domestiche e tioli come variabili in grado di contribuire alla variabile dipendente ExSBP/W

Discussione e Conclusioni. Anomala risposta pressoria allo sforzo non solo nei diabetici tipo 1, ma anche ai parenti asintomatici, normotesi e non diabetici, associata ad indici di insulino-resistenza e danno ossidativo.

LIVELLI DI OMOCISTEINA PLASMATICI IN UNA COORTE DI PAZIENTI ITALIANI HIV POSITIVI**F-18****Di Iorio G., Parruti G*, Marani Toro G*, Florindi R., Moccia F., Patriarca E., Piattelli E., Riaro Sforza G.**

Lab. Analisi Chimico cliniche e microbiologia, * Divisione malattie infettive Ospedale Spirito Santo Pescara

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

Materiali e Metodi: Abbiamo misurato i livelli plasmatici di omocisteina totale utilizzando "IMX HOMOCYSTEINE SYSTEM" della ditta ABBOTT Diagnostics Division USA che utilizza un dosaggio immunologico a fluorescenza con luce polarizzata (FPIA) su plasmici o sieri freschi o congelati a -80 °C. Tra l'Ottobre 2004 ed il Febbraio 2005, 105 (89.7%) dei 117 pazienti in HAART nel servizio di DH-Malattie Infettive sono stati testati così come 25 pazienti HIV infetti non trattati e 60 donatori sani locali accostati per età sesso durata dell'infezione, livello della malattia, schema dell'HAART, tolleranza dell'HAART, risposta immune all'HAART, valori di colesterolo e trigliceridi sono stati valutati per la possibile associazione con i livelli di omocisteina plasmatici.

Risultati: La media dei valori di omocisteina è stata 15.04 +/- 7.9 mmol/L nei pazienti HIV in schema HAART, 13.08 +/- 8 mmol/L nei pazienti HIV non trattati e 10.9 +/- 5.1 mmol/L nei controlli sani (p < 0.01). Iperomocisteinemia è stata rilevata nel 54.4 % dei maschi trattati contro il 23.3 % dei controlli ed il 26.7% delle femmine trattate contro il 6.7% dei controlli (p < 0.01).

Pazienti con scarsa risposta immune allo schema HAART (CD 4 + T cell < 200/u/L) avevano significativi bassi livelli di omocisteina plasmatici (p < 0.05), laddove pazienti in schema NNRTI rispetto a regimi HAART hanno mostrato una tendenza a livelli più bassi di omocisteina

Conclusioni: I nostri risultati suggeriscono che aumenti dei valori di omocisteina plasmatici possano essere frequenti tra i pazienti HIV in schema HAART. Così come un incremento del rischio cardiovascolare possa minacciare l'efficacia dello schema HAART, sarebbe pertanto auspicabile un approfondimento delle conoscenze sulla prevalenza e la predittività dell'iperomocisteinemia in questo tipo di pazienti.

Bibliografia:

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

Cattaneo M. hyperhomocysteinemia atherosclerosis and thrombosis. Thromb.Haemost. 1999; 81:165-76.

Ridker PM., Manson JE., Buring JE., et al. A prospective study of Homocysteine and risk of cardiovascular disease among postmenopausal women. JAMA 1999; 281: 1817-21.

Lussier Cacan S., Xhignesse M., Piolot A., et al. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex specific relation with biological traits. Am. J. Clin. Nutr. 1996; 64: 587-93.

Refsum H., Ueland PM., Nygard O., et al. Homocysteine and cardiovascular disease. Ann.Rev. Med. 1998; 49: 31-62.

Ueland PM., Refsum H., Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. J. Lab. Clin. Med. 1989: 473-501.

DIAGNOSTICA DEL DIABETE AUTOIMMUNE LATENTE DELL'ADULTO: ANTI GAD65, ANTI IA2, ANTI INSULINA ED ANTI INSULA PANCREATICA**F-19****Vitillo M., Di Gregorio A.O., Cuomo L., Magliocca V., Cianconi A.M.*, Gelli A.*, Urbani A.*, La Rocca S.**

U.O.C. Patologia Clinica, *U.O.S. Diabetologia, Azienda Complesso Ospedaliero S. Filippo Neri, Roma

Scopo del lavoro. Nel diabete autoimmune latente dell'adulto (LADA) risulta positiva la ricerca di autoanticorpi diretti verso diversi antigeni pancreatici. Nel presente studio abbiamo valutato l'efficacia diagnostica nel LADA dei dosaggi degli autoanticorpi anti-decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD 65), anti-tirosinfosfatasi (IA2), anti-insulina (AIA) e della ricerca degli anti-insula pancreatica (ICA).

Materiali e metodi. Sono stati studiati 195 pazienti (età media 45 anni, range 13-80 anni) con diagnosi di diabete mellito afferenti all'ambulatorio di Diabetologia. Il dosaggio degli autoanticorpi anti-GAD 65 ed anti-IA2 è stato eseguito con metodiche radioimmunologiche CIS Schering, quello degli anti-insulina con il kit RIA quantitativo CentAK-IAA MEDIPAN, quello degli anti-insula pancreatica in immunofluorescenza su pancreas di scimmia (IFA ICA-IgG PANTEC). I soggetti con età > 35 anni e GAD65 e/o IA2 positivi sono stati diagnosticati come LADA. Sulla base di tale classificazione è stata condotta la valutazione dell'efficacia diagnostica degli AIA e degli ICA.

Risultati. Tra i 195 pazienti 34 sono risultati positivi per GAD65 (17.4%), 19 per IA2 (9.7%), 16 per ICA (8.2%) e 48 per AIA (24.6%). Nel sottogruppo dei 152 pazienti con età > 35 anni, 25 sono risultati GAD65 e/o IA2 positivi e sono stati classificati come LADA. Di questi 4 soltanto sono risultati ICA positivi (sensibilità 16%) e 12 AIA positivi (sensibilità 50%), mentre negli altri 127 diabetici non classificati come LADA gli ICA sono risultati sempre negativi (specificità 100%) e gli AIA sono risultati positivi in 23 casi (specificità 82%).

Discussione e conclusioni. Dai dati presentati si evince che la ricerca degli ICA eseguiti in IFA su substrato eterologo (l'unico in commercio), anche se dimostra un'elevata specificità, risulta possedere una bassa sensibilità nell'individuazione di pazienti con diabete di tipo LADA diagnosticati come tali tramite positività a GAD65 e/o IA2. Anche la positività degli AIA in tali soggetti non supera il 50%. In conclusione i risultati ottenuti non suggeriscono la ricerca degli ICA, eseguita su substrato eterologo, né quella degli AIA come test aggiuntivi rispetto a GAD65 e IA2. Poiché la positività del GAD65 è presente nell'82.6% dei LADA, il protocollo diagnostico per LADA potrebbe prevedere la ricerca di GAD65 in prima battuta, seguita da quella di IA2 solo in caso di negatività. La ricerca degli AIA potrebbe essere utilizzata in terza battuta, solo con la certezza che il paziente non sia stato trattato in passato con terapia insulinica.

DISTRIBUZIONE DEI PRINCIPALI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE E VALUTAZIONE DEL RISCHIO ASSOLUTO IN UNA POPOLAZIONE DI DONATORI PERIODICI DI CATANZARO

F-20

Russo MG*, Dominijanni A., Talerico R., Talerico F.°, Puzzonina P., Zimmatore G.°, Gulletta E.*

Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, °Divisione di Medicina Interna, Azienda Ospedaliera Pugliese Ciaccio, *Cattedra di Patologia Clinica, Università Magna Graecia, Catanzaro.

Scopo dello studio. Valutare la distribuzione dei livelli dei principali fattori di rischio coronarico nella popolazione di donatori di sangue dell'area di Catanzaro. Valutare la distribuzione del rischio cardiovascolare assoluto nella stessa popolazione. Individuare nell'ambito della popolazione soggetti a rischio cardiovascolare alto o molto alto che necessitano di attenzione medica per eventuali interventi dietetici e/o terapeutici.

Materiali e metodi. Dai questionari distribuiti ai donatori, dagli esami di laboratorio e dalle visite svolte in occasione della donazione, sono stati ricavati i dati antropometrici, clinici e biochimici di 639 donatori. La stima del rischio cardiovascolare (probabilità % di avere eventi cardiovascolari nei successivi 10 anni) è stata effettuata utilizzando l'algoritmo ricavato dallo studio di Framingham. La stima del rischio è basata sul ruolo predittivo di età, sesso, pressione sistolica, colesterolo totale, colesterolo HDL, fumo e presenza di diabete e/o di ipertrofia ventricolare sinistra.

Risultati

N = 639

SESSO: 465 maschi (73%), 174 femmine (17%)

ETA': 44,4 ± 13,6 anni (min 20 - max 74)

FUMO: 488 non fumatori su 639 (76,3%)

BMI: 25,6 ± 3,1

GLICEMIA: 88,7 ± 12,2 mg/dL

PAS: 126,9 ± 1,9 mm Hg

PAD: 83,7 ± 5,2 mm Hg

CT: 189,8 ± 37,1 mg/dL

C-LDL: 143,1 ± 28,7 mg/dL

C-HDL: 42,2 ± 9,4 mg/dL

TG: 125,2 ± 60,1 mg/dL

Rischio cardiovascolare 8,3 ± 7,8 %

Conclusioni. I donatori di sangue di Catanzaro sono una popolazione sana a basso rischio cardiovascolare; tuttavia essi presentano, con frequenza relativamente elevata, isolati fattori di rischio; ad esempio 164 soggetti hanno una PAS >140 mm Hg, 87 mostrano livelli di colesterolo >240 mg/dL, 95 livelli di colesterolo HDL <35 mg/dL, 15 sono diabetici. Queste osservazioni indicano che fattori di rischio cardiovascolari sono presenti in soggetti ritenuti sani e che quindi non ricevono la dovuta attenzione. Inoltre è stato possibile individuare 55 soggetti (8,7%) il cui rischio cardiovascolare risulta elevato (>20%).

IMPIEGO DELLA VES AUTOMATIZZATA IN PEDIATRIA. NOSTRA ESPERIENZA CON IL ROLLER 20 (ALIFAX-ITALIA)

G-01

Parco S., Donato M., Tamaro G.

Dipartimento di Medicina di Laboratorio - IRCCS Burlo Garofolo - Trieste

Scopo del lavoro. La rivalutazione in pediatria della velocità di eritrosedimentazione (VES) come parametro di patologia infiammatoria e non, ha portato allo sviluppo di sistemi in automazione che impiegano 150 µl per l'analisi e la effettuano in un tempo di circa 20 secondi. Ci siamo proposti di valutare l'efficacia dell'utilizzo di uno strumento di recente acquisizione nella nostra popolazione pediatrica.

Materiali e metodi. È stato impiegato il Roller 20 (Alifax-Italia) che esegue batterie di 18 campioni per VES in completa automazione da provetta di emocromo con EDTA 3K. Sono stati studiati per riferimento 120 campioni di bambini che affluivano all'ambulatorio di chirurgia pediatrica per esami di controllo non inerenti a patologie infiammatorie (60 maschi e 60 femmine divisi in due fasce d'età: 0-12 aa e 13-18 aa). La nostra attenzione si è poi rivolta ai campioni dei pazienti oncologici all'esordio: 60 pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta.

Risultati. Nei bambini sani i valori di riferimento, riportati in tabella, erano sostanzialmente uguali, indifferentemente alla fascia d'età ed al sesso: limite superiore per valore medio + 1 ds = 10.

maschi 1-12 aa: 5.34 +/- 4.59; 13-18 aa: 4.38 +/- 3.57

femmine 1-12 aa: 5.65 +/- 4.63; 13-18 aa: 5.20 +/- 3.91

Nei pazienti oncologici sono stati riscontrati dati parzialmente disomogenei (16-120), anche se tutti superiori al valore limite. Il monitoraggio all'esordio è stato effettuato utilizzando l'esame emocromocitometrico (comprensivo di formula leucocitaria e piastrine), la proteina C reattiva, le proteine della fase acuta, il fibrinogeno.

Discussione e conclusioni. La semplicità dell'analisi, il suo basso costo e soprattutto la minima quantità di sangue impiegato, confortano sul reimpiego della VES come esame da effettuare all'esordio ed alla remissione di malattia leucemica, valido sistema di monitoraggio terapeutico, standardizzato per temperatura di analisi, quantità di sangue analizzato, tempo di lettura e miscelazione del campione.

Bibliografia de Jonge et al. Erythrocyte Sedimentation Rate by the Test-1 Analyzer. Clin Chem 46, No 6, 2000, 881-2

RIORGANIZZAZIONE DEL LABORATORIO ANALISI DELL'AZIENDA OSPEDALIERA S. ANNA DI FERRARA: UNA RISPOSTA ADEGUATA ALLE ESIGENZE FUTURE

G-02

Guerra G., Bassi C., Carrieri M.*, Rigolin F.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, *D.A. Infermieristica, Tecnica e della Riabilitazione. Azienda Ospedaliera S. Anna di Ferrara

Nell'ottica del rapido consolidamento della sanità, il laboratorio analisi viene considerato come il primo elemento da sottoporre a tale processo. Attenti a questa realtà che sta velocemente cambiando abbiamo voluto introdurre un cambiamento radicale. L'obiettivo generale è pertanto finalizzato all'adeguamento ed ammodernamento tecnologico, al miglioramento dell'efficienza e degli standard di sicurezza ed al raggiungimento dell'eccellenza diagnostica delle prestazioni erogate. L'ipotesi di lavoro è rappresentata dalla reingegnerizzazione dell'intero flusso produttivo finalizzata all'inserimento di un sistema preanalitico che comprenda tutti i settori di laboratorio e mediante l'accorpamento di tutte le attività su pochi strumenti multiparametrici, creando un'unica area ad alta automazione (Core-Lab), superando anche la logica del settore dedicato alle urgenze.

E' stato pertanto impostato un appalto concorso e redatto un capitolato di gara con un solo lotto infrazionabile richiedente la fornitura di dispositivi analitici e preanalitici, reagenti, calibratori, materiali di consumo, assistenza tecnica, servizi di supporto per la formazione, un sistema di emogasanalisi (POCT), adeguamento degli spazi nella logica dell'open space, adeguamento degli impianti, eventuali arredi adeguati alla strumentazione in oggetto, eventuali centrifughe e frigo-congelatori, sistema informatico gestionale di laboratorio. Il tutto deve garantire comunque un TAT reale massimo di 2 ore per la routine e inferiore a 30 minuti per gli esami con carattere di emergenza mantenendo costantemente la tracciabilità del campione dalla fase preanalitica fino al suo stoccaggio od eliminazione. La ripartizione del punteggio è stata suddivisa in 60 punti per la qualità e 40 punti per il prezzo. Al bando hanno risposto 3 ATI (Associazione Temporanea d'Impresa).

E' stata valutata la documentazione presentata da parte di una commissione tecnica nominata dalla Direzione Generale che ha lavorato in sottocommissione in base alle competenze professionali effettuando anche sopralluoghi presso altre strutture. L'aggiudicazione è stata fatta all'ATI che ha ottenuto un punteggio qualità/prezzo pari a 99,77. Il punteggio delle altre due ATI è rispettivamente di 69,96 e 65,50.

Il risultato di un sistema così configurato può consentire la creazione di una rete di laboratori della provincia integrati con livelli funzionali diversi nel concetto di area vasta (Hub and Spoke). La realizzazione di un siffatto progetto soddisfa i principi economici a parità di prestazioni per un aumento dell'efficienza, non subordinando obiettivi economicistici a quelli professionali.

OTTIMIZZAZIONE DEI TEMPI CON SODDISFAZIONE DI CLIENTI ED OPERATORI

G-03

Scarso R., Botto A., Murialdo M., Piva C., Minetti F.

Dipartimento di patologia clinica ASL 2 Savonese-Ospedale San Paolo-Savona

Scopo del lavoro: Descrizione della introduzione da parte dei laboratori analisi della ASL2Savonese (3 Ospedali) del programma DNWEB per l'accettazione degli esami di laboratorio, stampa etichette, visualizzazione risultati direttamente nelle varie U.O., ed utilizzo del CPD, catalogo delle prestazioni di diagnostica.

Materiali e metodi: Il programma DNWEB permette al personale delle varie U.O. di effettuare l'accettazione degli esami utilizzando 3 diverse maschere (in base al livello di urgenza della richiesta) configurate in modo da renderle di facile ed agile consultazione. Queste maschere contengono tutti gli esami eseguibili nei laboratori; suggeriscono numero e tipo di provetta necessaria e, ove possibile, forniscono anche indicazioni ulteriori. Tutta l'attività avviene previa digitazione di password nel rispetto delle leggi sulla privacy. A tutte le U.O. è stato caricato, su computer, il CPD (eventualmente stampabile) direttamente consultabile in fase di accettazione.

Risultati: Il programma DNWEB ha cambiato l'attività del personale del U.O.: permettendo di effettuare tutte le accettazioni e le eventuali modifiche necessarie (integrazione o cancellazione esami, inserimento note o motivazioni al prelievo, ecc.) e di stampare le etichette barcode da attaccare sulle provette (l'identificazione primaria del materiale è effettuata direttamente al letto del paziente). Le provette vengono consegnate al laboratorio da un pedone o dal personale delle U.O.; il Pronto Soccorso si avvale invece di un sistema di posta pneumatica. Appena i campioni giungono in laboratorio vengono immediatamente processati, riducendo di fatto a zero i tempi necessari per la lettura della scheda ottica e l'etichettatura delle provette (prima variabili dai 30' ai 120'). Il clinico può disporre dei risultati non appena validati, con notevole riduzione del TAT (dalle 3 alle 6 ore). Il personale del laboratorio si è occupato direttamente della formazione degli operatori di reparto, fornendo anche una dettagliata istruzione di lavoro agevolmente consultabile. La correttezza delle operazioni viene monitorata utilizzando un data base creato ad hoc per registrare ed elaborare le Non Conformità generate utilizzando il programma DNWEB; questo permette di evidenziare eventuali criticità e poter programmare ulteriori incontri formativi per colmare le lacune presenti.

Discussione e conclusione: L'utilizzo del programma DNWEB e del CPD ha permesso di raggiungere importanti obiettivi: i clinici possono ottenere risposte rapide ed accurate con risparmio di risorse umane e riduzione dei tempi di degenza contenendo così i costi; il laboratorio ha visto la riduzione degli errori in accettazione ed il contenimento del numero di richieste telefoniche di spiegazioni circa l'invio del materiale.

ESEMPIO ORGANIZZATIVO DELL'AZIENDA SANITARIA DI BOLZANO PER IL BISOGNO FORMATIVO DEL PERSONALE TECNICO DI LABORATORIO

G-04

Dal Checco P., Tait M., Daves M., Peer E., Scala S.

Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano

Scopo del lavoro. Descrivere il modello organizzativo adottato dal nostro Laboratorio per soddisfare il bisogno formativo del personale tecnico sanitario di laboratorio (TSLB)

Materiali e metodi. La Provincia Autonoma di Bolzano ha recepito dal 2002 gli obblighi formativi imposti dal Ministero della Salute (programma ECM). Con l'aumento della domanda si è evidenziata la scarsità di eventi proposti a livello locale. Nel 2003 è nata la sezione SIMeL TSLB Alto Adige, che da subito ha avviato un'attiva collaborazione con l'Ufficio Formazione ed Aggiornamento, nell'organizzare eventi formativi sfruttando risorse strutturali e umane presenti nell'Azienda; annualmente viene creato un calendario dell'aggiornamento aziendale. L'accreditamento degli eventi avviene gratuitamente da parte della Provincia la quale per suo statuto ha istituito una Commissione Provinciale per la formazione continua (delibera della Giunta Provinciale n. 4220/2002). Gli accreditamenti avvengono come a livello nazionale, ma in tempi più brevi (45 giorni circa) e sono parificati a quelli nazionali dalla Conferenza Stato-Regioni

Risultati. Sono stati organizzati nel 2004, 4 corsi residenziali: (POCT, tecniche di citogenetica, elettroliti, tecniche laboratoristiche). Per il 2005 sono stati organizzati 6 eventi (fase preanalitica, patologie delle vie urinarie, biologia molecolare, dosaggi ormonali, emogasanalisi).

Discussione e Conclusioni. Tale modello ha portato numerosi vantaggi: la quasi totale copertura per TSLB dei crediti formativi richiesti; una notevole crescita professionale; un risparmio economico per l'Azienda; la creazione di una figura responsabile della formazione per TSLB economicamente incentivata dall'articolo 26 comma 4 del Contratto Provinciale del Personale del Servizio Sanitario.

VALUTAZIONE ORGANIZZATIVA DELL'UTILIZZO DI DUE ANALIZZATORI AUTOMATICI PER LA DETERMINAZIONE DELLA VES

G-05

Cabrini E., Vaghi U.

U.O. di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Giuseppe-AfaR, Milano

Scopo del lavoro. L'importante ruolo della VES come indicatore aspecifico di malattia è sostanzialmente confermato nella letteratura medica ed è stato oggetto di studi e valutazioni volti a chiarire le componenti che concorrono al fenomeno della sedimentazione, le eventuali correlazioni con la concentrazione di altre molecole e gli elementi che standardizzassero la metodica. Queste ricerche suscitavano ulteriore interesse nel momento in cui la VES venne centralizzata nei laboratori di analisi, con la comparsa di problemi metodologici e organizzativi, che hanno spinto verso l'utilizzo di sistemi automatici. Scopo del presente lavoro è quello di confrontare tra loro due analizzatori automatici VES-Matic 30 e TEST-1.

Materiali e metodi. Le VES sono state determinate utilizzando campioni di sangue provenienti da 200 pazienti ricoverati presso l'Ospedale San Giuseppe di Milano, utilizzando provetta Vacutainer con anticoagulante K3EDTA su TEST-1 e provetta VACU-TEC con sodiocitrato 0,105M per quattro volumi di sangue come anticoagulante su VES-Matic 30. Sulla provetta per TEST-1 è stato dosato il valore di ematocrito con strumentazione GEN-S Coulter.

Discussione e Conclusioni. Entrambe le strumentazioni evidenziano soddisfacenti caratteristiche di automazione. L'utilizzo su TEST1 della stessa provetta dell'emocromo costituisce un vantaggio organizzativo e di risparmio di risorse economiche. Per quanto riguarda il Ves-Matic 30, utilizzando una provetta dedicata, il costo dell'esame e l'impatto organizzativo sui reparti risulta maggiore, per la necessità di un corretto riempimento e di una adeguata miscelazione. A fronte delle considerazioni organizzative, si evidenzia una bassa correlazione tra i due strumenti ($R=0,76849$). Ciò fa ritenere che per la determinazione della VES con lo strumento TEST1, l'utilizzo di algoritmi matematici determini una variabilità dei risultati legata a fattori non facilmente identificabili. Al riguardo sembra avere una certa rilevanza il valore di ematocrito. Sono stati valutati 32 pazienti in cui i valori di VES risultavano particolarmente contrastanti. La storia clinica ha evidenziato in tutti la presenza di una patologia che correlava con un aumento della VES, e in cui era presente un calo dell'ematocrito. I valori ottenuti con lo strumento TEST1 risultavano inferiori al livello decisionale, fornendo di fatto un dato falsamente negativo. Questa considerazione senza inficiare la validità della strumentazione TEST1, impone di fatto la necessità di valutare sempre il valore di ematocrito. Inoltre, la non buona correlazione ottenuta, impone al laboratorio che voglia utilizzare TEST1, di procedere ad un periodo preliminare di valutazione dei risultati, al fine di ottenere valori di riferimento e livelli decisionali che siano rappresentativi della popolazione.

PRIVACY E SECURITY: COSTO O OPPORTUNITÀ PER IL LABORATORIO CLINICO?**G-06****Cinquanta L.**

Laboratorio Patologia Clinica Az. Osp. San Giovanni di Dio e Ruggi D' Aragona Salerno

Scopo del lavoro. Il nuovo Codice della privacy introdotto con il D. Lgs. 196 del 30/6/2003 riforma sostanzialmente la materia e indica le misure minime di sicurezza e le sanzioni per gli inadempimenti. La soluzione è dimostrare di aver adottato tutte le misure idonee per la sicurezza dei dati (tecniche, informatiche, organizzative, logistiche o procedurali) dopo la puntuale analisi dei rischi, valutando gli eventi critici e la probabilità che possano verificarsi.

L'elenco delle "misure minime di sicurezza" comprende, ad esempio: l'obbligo di adottare un sistema di autenticazione informatica (credenziali di autenticazione e password) e di autorizzazioni, la necessità di proteggere i dati personali contro il rischio di intrusione e di azione di programmi dannosi quali ad esempio virus informatici (installazione di firewall e di antivirus), l'obbligo di prevedere aggiornamenti periodici dei software volti a prevenire la vulnerabilità degli strumenti elettronici, la necessità di adozione di procedure per la custodia di copie di sicurezza dei dati e per il ripristino della disponibilità degli stessi e dei sistemi (piano di disaster recovery), l'obbligo di tenere un documento programmatico sulla sicurezza (DPS) aggiornato, la necessità di adottare tecniche di cifratura o codici identificativi per il trattamento di dati sensibili, come quelli idonei a rivelare lo stato di salute.

Materiali e Metodi. Sono state analizzate le varie fasi del processo di adeguamento alla normativa vigente per la Privacy in 14 Laboratori Clinici della Regione Campania, valutando i contenuti e le modalità operative delle procedure implementate, non trascurando i punti critici emersi. Lo studio è stato condotto mediante esame della documentazione predisposta, compilazione di check-list e colloqui con responsabili ed incaricati del trattamento dei dati.

Risultati. Il nuovo codice della Privacy risulta applicato generalmente in modo conforme nei Laboratori Clinici esaminati soprattutto per ciò che è previsto dalle 29 regole incluse nell'Allegato B (Disciplinare Tecnico) del codice. Emerge tuttavia la sensazione che la norma e la redazione del DPS sono recepite come adempimenti burocratici e, quindi, come mero costo.

Discussione e Conclusioni. E' auspicabile che la revisione dei processi informativi all'interno dell'infrastruttura del Laboratorio Clinico dovrebbe essere considerata come un'occasione per individuarne i punti deboli, rafforzandoli per diminuire gli sprechi e i rischi legati alla perdita, all'alterazione e all'uso improprio dei dati trattati e, infine, per orientare l'informazione prioritariamente sul paziente, più che sulla patologia.

1. D. Lgs 196/2003, "Codice in materia di protezione dei dati personali".

2. Italia V. et Al. Codice della Privacy - Tomo I - Giuffrè Ed. 2004.

UN ANNO DI GOVERNO DEGLI ESAMI IN POINT OF CARE TESTING. L'UTILIZZO CLINICO E LA VALUTAZIONE COMPARATA DEI COSTI PER L'AZIENDA SANITARIA**G-07****Carmignoto F., Lucchiari A., Camerotto A.**

Dipartimento di Patologia Clinica, Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Trecenta, Azienda ULSS 18, Rovigo

Scopo del lavoro. Che l'attivazione di POCT porti a vantaggi per l'assistenza ma anche ad un notevole risparmio di spesa è motivo di discussione e non sono disponibili dati consolidati. Ad un anno dall'attivazione di un'organizzazione in POCT, ne abbiamo valutato l'impatto sulla richiesta di test i sui costi sostenuti.

Materiali e metodi. Presso l'Ospedale di Trecenta, da marzo 2004, sono attive 2 stazioni di POCT, in Pronto Soccorso ed in Medicina. La strumentazione è gestita da un SW dedicato in rete con il Laboratorio ed i processi governati in ISO 9001:2000. La responsabilità è del Primario del Laboratorio. Gli esami sono eseguiti dal personale infermieristico e durante l'orario di attivazione dei POCT il Laboratorio è chiuso. In precedenza era prevista guardia tecnica attiva.

Risultati. Sono esaminati i dati delle prestazioni ed i relativi costi, confrontando l'anno 2003, senza POCT, vs il 2004 con servizio di analisi decentrate attivo. I dati del 2003 sono stati elaborati considerando le stesse fasce orarie di attività dei POCT. La valutazione dei costi è comprensiva di tutti i costi aggiuntivi per l'azienda, anche al di fuori del Laboratorio. Il confronto del numero di richieste evidenzia che la gestione delle urgenze in POCT ha comportato una diminuzione complessiva degli esami del 37.98 % (16491 test rispetto a 26593), con riduzioni particolarmente accentuate (oltre il 50%) per INR, aPTT, Bilirubina, amilasi e calcio. Alla riduzione del costo di 3 unità di personale tecnico (in quiescenza e non sostituito) e ai minori costi per il laboratorio sono sottratti i costi aggiuntivi per il personale infermieristico, (addestramento e incentivazione). Si conferma la grande differenza del costo/test: € 7.62 in POCT vs 1.16 del laboratorio. Se i costi strutturali sono sostanzialmente in pareggio, si evidenzia come siano necessarie considerevoli risorse economiche nella fase di implementazione.

Discussione e Conclusioni. Una corretta analisi economica deve tenere in considerazione tutte le spese necessarie di una nuova organizzazione, al fine di fornire chiare indicazioni sul bilancio costi/benefici. Se è rilevante il risparmio sul versante del personale tecnico, il costo/test elevato in POCT porta i costi complessivi strutturali sostanzialmente a pareggio. E' necessario tuttavia considerare come risultino notevoli i costi per la fase di implementazione. E' comunque possibile che il consolidamento, la maggiore esperienza e le minori necessità di addestramento possano portare, già dal secondo anno, significativi vantaggi economici. Sono necessari in ogni caso ulteriori studi per valutare anche le ricadute economiche sull'appropriatezza della richiesta e sull'outcome.

IL TECNICO SANITARIO DI LABORATORIO NELLA GESTIONE DEL DATO ANALITICO**G-08****Villani A.*, Michelotti M.**, Carrara N.***, Como F.****, Lazzerini S.*****, Ribero S. *****

* ASL10 Pinerolo Torino, **Osp. Mauriziano Torino, *** Osp. S.Croce e Carle Cuneo, ****ASL 22 Novi Ligure, *****Ospedale San Giovanni di Dio Firenze

Scopo del lavoro. Esaminare il processo, dal punto di vista del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico (TSLB), in tutte le sue fasi. Creare una cultura condivisa e collaborativa, che permetta di riconoscere le responsabilità interne, per riuscire ad identificare nella maniera più efficace le varie tipologie di criticità. Favorire la segnalazione di eventi avversi e inattesi.

Materiali e metodi. Periodo di studio: un anno. Ogni professionista, proveniente per la maggior parte da strutture certificate e/o accreditate, ha raccolto i dati provenienti dai diversi settori analitici mettendo in evidenza i punti più vulnerabili del processo, valutando la ricaduta dei possibili errori, cercando di individuare aree di criticità, per consentire, ad una successiva verifica, interventi mirati onde poter ridurre il numero degli errori a garanzia di un dato più sicuro.

Risultati

Percentuali globali di errori:	pre-analitici -ppm	analitici -ppm	post-analitici -ppm
Chimica clinica	600	0.1	1
Ematologia coagulazione I	160	1	1
Immunometria I	1000	500	500
Biologia Molecolare	30	1	1
Microbiologia	5911	313	154
Validazione finale	5033		177

Discussione e conclusione. La normativa (ISO 9001:2000 – ISO 15189) presta particolare attenzione ai prodotti che entrano nel ciclo produttivo, grazie ad un continuo monitoraggio. La registrazione degli inconvenienti, e relativa risoluzione, permette di effettuare adeguate azioni correttive e garantire una buona qualità del prodotto erogato. Il “risultato” è l’espressione diretta dell’attività, responsabilità, del TSLB, valutato alla luce dei controlli indispensabili per garantirne l’esattezza e la qualità. Tali atti si espletano dalla fase preanalitica alla fase analitica fino alla validazione tecnica dei valori ottenuti, attraverso una corretta e responsabile valutazione critica del dato analitico.

LA CONDIVISIONE DIPARTIMENTALE DELLE CONOSCENZE SCIENTIFICHE ACQUISITE**G-09****Caleffi A., Bonaguri C., Dazzi R., Boniburini M.*, Fanti A.*, Sirocchi L.*, Cocconi A.*, Monica C.**

Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, *Settore Formazione e Aggiornamento

Azienda Ospedaliero - universitaria, Via Gramsci 14-43100 Parma

Scopo del lavoro: l’aggiornamento scientifico del personale sanitario, secondo l’Educazione Continua in Medicina, è divenuto obbligo istituzionale oltre che deontologico e pone alle Aziende Sanitarie alcuni nuovi problemi di gestione. Stimolati e supportati dal Settore Formazione della nostra Azienda ci siamo impegnati sin dai primi anni (2003) come Referenti Dipartimentali della Formazione con gruppi di lavoro interprofessionali (medici, infermieri, biologi, tecnici sanitari, amministrativi). Lo scopo è quello di ottimizzare le fasi del processo anche in riferimento agli obiettivi di formazione scientifica che vengono individuati dalle norme dell’accreditamento regionale. Quest’anno abbiamo analizzato il problema della condivisione dipartimentale delle conoscenze scientifiche acquisite con riferimento ad eventi formativi svolti all’esterno dell’Azienda.

Risultati e Discussione: il gruppo di lavoro ha analizzato i problemi, discusso i metodi e proposto un progetto di procedura come documento finale. Il Piano Formativo che già da alcuni anni si propone alla Direzione Aziendale manca ancora di una efficace analisi strategica; le proposte di iniziative esterne risultano spesso lasciate alla determinazione del singolo professionista; poca è la elaborazione di proposte formative studiate per equipe; scarsa la trasmissione ai colleghi delle informazioni acquisite. Serve quindi: 1) strategia annuale di indirizzo formativo per equipe (le figure coinvolte sono: il Direttore di Dipartimento e il RDF, il documento prodotto è il Piano Formativo Aziendale); 2) riunioni per comunicazioni scientifiche intraequipe con distribuzione del materiale didattico del professionista e trasmissione ai colleghi delle informazioni acquisite (le figure coinvolte sono: il professionista e le equipe, i documenti sono: il verbale delle riunioni e il materiale didattico fornito); 3) stesura ad opera del RDF di un opuscolo riassuntivo annuale con archivio cartaceo-informatico e libero accesso a biblioteca virtuale in Intranet per gli operatori sanitari interessati; 4) aggiornamento ad opera del Settore Formazione, coadiuvato dai vari RDF, della biblioteca virtuale. La procedura, dopo discussione e condivisione con tutti i RDF aziendali, è in via di sperimentazione.

Conclusioni: le scarse risorse disponibili ci costringono a cercare soluzioni per giungere ad obiettivi di qualità eliminando gli sprechi.

Bibliografia: 1) Bonucci L., Cinotti R., Distante C., Magi B., Renzi A.M.’’ Il sistema qualità per l’accreditamento istituzionale in Emilia-Romagna’’.cap:6-Formazione. Collana dossier n.97, Agenzia sanitaria regionale-Regione Emilia-Romagna, 2004.

LA RILEVAZIONE DIPARTIMENTALE DEL FABBISOGNO FORMATIVO**G-10****Caleffi A., Bonaguri C., Dazzi R., Boniburini M.*, Fanti A.*, Sirocchi L.*, Cocconi A.*, Monica C.**Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, *Settore Formazione e Aggiornamento
Azienda Ospedaliero-universitaria Parma

Scopo del lavoro: l'aggiornamento scientifico del personale sanitario rappresenta oggi, con l'ECM, un grande impegno di risorse. Insieme con il Settore Formazione della nostra Azienda ed in qualità di Referenti Dipartimentali della Formazione cerchiamo di collaborare con gruppi di lavoro multidisciplinari (medici, biologi, infermieri, tecnici sanitari, amministrativi) per migliorare la pianificazione gestionale. Lo scopo è quello di ottimizzare le fasi del processo in riferimento agli obiettivi di formazione che vengono individuati dalle norme dell'accreditamento regionale. Uno dei primi problemi è quello della rilevazione annuale del fabbisogno formativo dipartimentale per la formulazione del Piano Formativo da proporre alla Direzione Aziendale.

Risultati e discussione: Il Laboratorio Analisi Emato-chimiche ha proposto una procedura dipartimentale. I punti irrinunciabili sono desunti dagli obiettivi formativi Nazionali, Regionali, Aziendali e sono: a) Informazione a tutto il personale sanitario (da attuare tra settembre e ottobre di ogni anno lavorativo); b) condivisione con i vari referenti dei settori delle Unità Operative (novembre); c) coinvolgimento del Direttore di Dipartimento con il RDF per la selezione (dicembre) delle proposte pervenute e formulate su schede interne. La selezione si completa chiedendo d) ai responsabili interessati di formalizzare la proposta secondo le schede aziendali (Evento formativo:scheda A; Comando: scheda B; Formazione sul Campo:scheda C); e) Il RDF riassume in un documento finale (gennaio) le proposte scientifiche e le eventuali spese. Il Piano Formativo così raccolto viene esaminato dalla Direzione Aziendale (febbraio-marzo) per l'approvazione finale.

Conclusioni: i RDF devono acquisire capacità di analisi delle risorse economiche ed umane, capacità di focalizzare i punti critici, di pianificare e di gestire processi complessi. La procedura così definita viene applicata dal Dipartimento Diagnostica di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Parma dal 2003 (anno di inizio del programma ministeriale per l'ECM). Ci sembra, ad oggi, il compromesso migliore tra scarsità di risorse, complessità gestionale e poca disponibilità in termini di tempo. Non si esclude di poter migliorare in un prossimo futuro la parte di strategia dipartimentale che dovrebbe precedere la pianificazione.

Bibliografia: 1) Bonucci L., Cinotti R., Distante C., Magi B., Renzi A.M. "Il Sistema Qualità per l'accreditamento istituzionale in Emilia-Romagna" collana Dossier, n.97. Agenzia sanitaria regionale -Regione Emilia-Romagna, 2004. 2) Obiettivi Formativi Nazionali per l'ECM (2001-2006), Regionali (2003-2005), Aziendali (2003-2005).

L'APPROPRIATEZZA NELLA RICHIESTE DI "TROPONINA E MIOGLOBINA" DA PARTE DEL PRONTO SOCCORSO DI UN OSPEDALE DI ZONA MONTANA**G-11****Marcolla A.*, Orsoni G.*, Menapace P.*, Zanon B.*, Fondriest R. ****

* Dipartimento di Laboratorio APSS di Trento: Ospedale di Cles; **Dipartimento di urgenza emergenza APSS di Trento: Ospedale di Cles.

Scopo del lavoro: considerato l'elevato costo dei nuovi marcatori di danno miocardio da un lato, ed il gravoso impegno da parte del personale di laboratorio nell'assolvere alla necessità di una loro rapida risposta dall'altro, si è insistito, in un incontro con i medici in servizio presso il pronto soccorso, circa l'importanza di un uso appropriato del protocollo in essere nella nostra azienda sanitaria. Infatti, con l'introduzione di questo protocollo avvenuta nel 2002, la richiesta di marcatori di danno cardiaco ha subito un costante incremento in tutti i pronto soccorso degli ospedali periferici della Provincia di Trento che, secondo gli autori, è probabilmente imputabile al sovrapporsi di richieste non sempre appropriate (inappropriatezza della richiesta). La logica conseguenza di questi comportamenti ha determinato, oltre ad un notevole aumento dei costi per la diagnosi di dolore toracico, un significativo aumento degli interventi da parte del personale tecnico di laboratorio in regime di pronta disponibilità, ed a volte, anche ad un allungamento dei tempi di risposta (> di 60min.).

Materiali e metodi: Si è quindi pensato di verificare se le sensazioni percepite sia da noi operatori di laboratorio, circa le modalità di richiesta, che quelle dei clinici circa l'allungamento dei tempi di risposta, corrispondessero effettivamente a realtà. Allo scopo abbiamo elaborato un protocollo operativo che prevedeva la registrazione da parte del personale tecnico in servizio di pronta disponibilità, di diversi dati significativi per tutte le richieste del nostro Pronto soccorso a partire dal 01/01/2005 fino al 31/03/2005.

Risultati: Gli accessi al pronto soccorso nei 3 mesi del nostro studio, sono stati 6.230; le richieste di esami hanno riguardato 1814 (29%) pazienti e fra questi, a 415 (7%) sono stati richiesti i marcatori cardiaci. Il sospetto diagnostico rilevato nelle 415 richieste con marcatori è stato il seguente: Sospetti diagnostici : n° totale/ n° di diagnosi diverse: a. problemi cardiologici: 150/20; problemi respiratori: 41/8; problemi cerebrali: 40/12; problemi gastrointestinali: 27/7; traumi vari: 14/4; disidratazione/febbre: 10/2; sanguinamenti: 9/3; malessere generalizzato: 7/2; trombosi/embolia : 6/2; diabete scompensato: 6/1; nintossicazioni: 3/2; altre diagnosi: 13/13; senza diagnosi: 89/4.

I tempi medi di risposta rilevati nel periodo di studio sono stati di 38 minuti. In 12 casi, pari al 2.9% delle richieste, i tempi di risposta hanno superato i 60 minuti (sempre motivate).

Conclusioni: Anche se i dati analizzati presi in considerazione in questo studio sono limitati e le considerazioni su cui lavorare sono molte, ci sembra di poter affermare che a tutt'oggi, l'appropriatezza della richiesta di marcatori cardiaci da parte del nostro pronto sia da migliorare. Sicuramente migliorabili sono anche i tempi medi di risposta del laboratorio, che vanno comunque di pari passo con che l'aspetto della appropriatezza della richiesta.

UTILIZZAZIONE DI UN NUOVO PROGRAMMA GESTIONALE PER L'ESECUZIONE DEGLI ESAMI URGENTI IN LABORATORIO ANALISI

G-12

De Cesaris S., Buggiani A., Bellucci G., Mazzantini V.

Dipartimento Patologia Clinica- Azienda USL 11 - Empoli - Toscana

Scopo del lavoro. L'attività per urgenze del Laboratorio Analisi è stata rimodellata utilizzando il sistema di codice a barre elaborato dal Personale del Dipartimento di Patologia Clinica.

Materiali e metodi. I Laboratori dei PP.OO. di Empoli, Fucecchio e Castelfiorentino eseguono, nell'arco delle 24 ore, circa 450000 esami l'anno. Gli esami vengono eseguiti sugli apparecchi COBAS Integra 400 plus ed Elecsys 2100 (Roche), BCS (Dade Behring), Sysmex K 4500 (DASIT), Mini Vidas (Biomèrieux), Aution Jet (Menarini). È stato ideato e realizzato dal Personale del Dipartimento un nuovo programma gestionale del settore urgenze. Le novità salienti del programma sono: implementazione del codice a barre e l'accettazione delle richieste che non viene più eseguita in Laboratorio Analisi, ma viene effettuata direttamente sul PC di reparto, tramite apposita interfaccia che si collega direttamente al PC gestionale del Laboratorio Analisi. I due programmi utilizzati sono: il gestionale del Laboratorio (GESTILAB) e l'interfaccia presente in tutti i reparti (URGEREP). Entrambi sono scritti in Microsoft Visual Basic 6.0 ed utilizzano un database in formato MYSQL. L'infermiere inserisce sul PC di reparto i dati del Paziente attingendo a dati anagrafici preesistenti, gli esami richiesti e stampa le etichette che applica sulle relative provette. Ogni etichetta riporta, oltre il codice a barre, cognome e nome del Paziente, data ed ora del prelievo, tipo di provetta da utilizzare. Quando le provette arrivano in Laboratorio, il Tecnico legge il codice a barre direttamente sulle provette con l'apposito lettore e sul PC compare la richiesta completa dei dati anagrafici e degli esami richiesti. Il Tecnico centrifuga le provette e le inserisce nei relativi apparecchi in modo del tutto casuale non essendo obbligato a rispettare nessun tipo di sequenza. L'apparecchio legge i codici a barre ed esegue gli esami, trasferendo i risultati al PC gestionale. Il programma, dopo che il Dirigente ha validato i risultati, provvede ad inviare automaticamente al reparto richiedente il referto completo della firma elettronica del Dirigente, registrando l'ora di emissione.

Risultati. Con questo nuovo programma sono stati eliminati una serie di inconvenienti soprattutto della fase preanalitica. Il TAT medio giornaliero (tempo fra accettazione in Laboratorio ed emissione del referto) è passato da 32' (2004) a 24' (primi 4 mesi di utilizzazione).

Discussione e conclusioni: La ridefinizione del modello operativo, ottenuta con il contributo di tutto il Personale ha consentito una riduzione del 25% del TAT con indubbi benefici sulla attività del Laboratorio e dei reparti di degenza.

ALFABETIZZAZIONE TELEMATICA NEI PAZIENTI IN TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE

G-13

Nicoli M., Facchinetti R., Rizzotti P.

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

Scopo del lavoro. Nella sorveglianza della Terapia Anticoagulante Orale (TAO) si vanno sempre più diffondendo forme telematiche di comunicazione dei dati clinici. Scopo del lavoro è valutare il grado di alfabetizzazione telematica dei Pazienti del nostro centro di sorveglianza (FCSA 186), per poi individuare i mezzi migliori di telecomunicazione ed ottimizzare gli sforzi di alfabetizzazione.

Materiali e metodi. A 104 Pazienti in TAO (m 59 %, f 31 %, età media anni 70, range 41-90, scolarità: Nessuna 5%, Elementari 32%, Medie 28%, Superiori 19%, Laurea 9%, non risponde 7%) è stato somministrato random un questionario.

Discussione e conclusioni. Il 63 % dei Pazienti è potenzialmente già operativo tramite SMS, direttamente o con l'aiuto di altri. Anche l'uso di e-mail, soprattutto indiretto, riguarda una percentuale soddisfacente (43 %). Per il fax, che pochi possiedono, occorre individuare luoghi di uso indiretto. Quasi la metà dei Pazienti non dispone di alcun mezzo, ma circa la metà di questi dichiarano di poter trovare aiuto. In generale fra i Pazienti vi sono le basi di alfabetizzazione perché il nostro centro FCSA possa iniziare un programma di refertazione telematica.

Risultati.

% PAZIENTI	CELL SMS	FAX	E-MAIL
DISPONE E SA USARE	35	15	13
DISPONE MA NON SA USARE	23	0	6
conosce qualcuno che lo può fare	13	0	5
non conosce	3	0	1
non sa	7	0	0
NON DISPONE	39	80	81
conosce qualcuno che lo può fare	15	21	25
non conosce	13	36	38
non sa	11	24	18
NON RISPONDE	4	5	1

% PAZIENTI POTENZIALMENTE GIÀ OPERATIVI	CELL SMS	FAX	E-MAIL
PER USO DIRETTO	35	15	13
PER USO INDIRETTO	28	21	30
TOTALE	63	36	43

% PAZIENTI CHE NON DISPONE DI ALCUN MEZZO TELEMATICO	
conosce qualcuno che lo può fare	44
conosce qualcuno che lo può fare	20
non conosce nessuno	10
non sa	14

GLI "SMA" SONO ANCORA TRA NOI

G-14

Nicoli M., Facchinetti R., Rizzotti P.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche O.C.M. Verona.

Scopo del lavoro. "SMA" è l'acronimo di Simultaneous Multiple Analyzer ed indica una serie di analizzatori della ditta Technicon in uso negli anni '70 e '80. La sigla SMA era seguita da un numero (4,6,20) che indicava il numero degli analiti. Nel nostro Laboratorio abbiamo utilizzato all'epoca gli SMA 4, 6, 12, e 20 (l'ultimo, dimesso nel 1988). Una corretta fase preanalitica esige che la definizione di test e profili sia univoca. Nel nostro Ospedale viene ancora impropriamente utilizzata la parola SMA per definire gruppi di esami. Lo scopo del lavoro è valutare l'utilizzo e verificare il livello di concordanza fra i reparti. *Materiali e metodi.* Indagine telefonica diretta alle caposala di 16 reparti di degenza. E' stato chiesto se fosse in uso la parola SMA e quali test fossero compresi nei vari SMA.

Risultati

Utilizzo SMA	N° REPARTI		Uso %
SI	13		81
NO	3		19
Quali SMA	N° REPARTI	Tipologie di profili	Uso %
4	8	2	27
6	10	9	33
8	1	1	3
9	1	1	3
12	0	0	0
20	10	2	33
COMBINAZIONI	N° REPARTI		Uso %
4+6	3		23
4+6+20	4		31
6+20	2		15
4+20	1		8
8+20	1		8
20	1		8
9	1		8

Discussione e conclusioni. L'81% dei reparti intervistati utilizza ancora la parola SMA per definire dei profili. Vi è discordanza fra i reparti sulla composizione di profili indicati con lo stesso numero, in particolare per lo SMA 6 (9 profili diversi). E' auspicabile l'abbandono del termine "SMA" e l'adozione del termine "profilo" seguito da sigle univoche. Il nostro Laboratorio ha intrapreso un'opera di standardizzazione introducendo profili definiti per problematiche cliniche pattuiti con i colleghi medici.

LA GESTIONE DELLA FORMAZIONE DEL PERSONALE DEL LABORATORIO NELL'ERA DELL'ECM

G-15

Ferrari A., Patuzzo R., Sartori F., Scandola S., Soldati M., Facchinetti R., Rizzotti P.

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

Scopo del lavoro: il nostro laboratorio si è interrogato su come gestire e regolamentare la formazione del personale attraverso: 1) l'attuazione del Programma per l'ECM, 2) l'assicurazione della possibilità di partecipare a eventi formativi, 3) la registrazione e l'elaborazione dei dati relativi all'attività formativa.

Materiali e Metodi: dal 2002 nel nostro laboratorio lavora il Gruppo per la Formazione del Personale (GFP) che prepara il piano formativo annuale, mantiene aggiornata la bacheca dei principali eventi formativi, organizza progetti formativi aziendali, raccoglie ed elabora i dati relativi all'attività individuale e verifica che quanto attuato soddisfi le esigenze formative del personale.

Risultati: in tabella sono riportati i dati relativi all'attività formativa svolta nel 2004. Il GFP ha monitorato le spese per la partecipazione a corsi esterni (circa 5900 ?), conteggiato le ore per la formazione (circa 3250) e raccolto l'opinione del personale attraverso questionari di gradimento.

Discussione e conclusioni: il GFP gestisce in maniera rigorosa la formazione nel nostro laboratorio e si pone come obiettivo futuro di valutarne le ricadute in termini formativi e di miglioramento organizzativo.

	Person e conteg giate	CREDITI						CORSI							
		Totale Crediti	Media	Da Progett i laborat orio	Da Corsi aziend ali	Da corsi esterni	Da FAD	Totale Corsi	Media	Progett i laborat orio	Aziend ali	Esterni	FAD	Addest rament o strume ntale	Interni No ECM
Medici	7	285	40,7	83	6	124	72	74	10,6	10	16	43	4	1	30
Biologi	7	331	47,3	109	69	153	0	58	8,3	12	11	35	0	0	40
Tecnici	33	1668	50,5	631	20	585	432	11	5,4	57	13	82	19	8	91
Infermier e	3	117	39,0	0	28	17	72	179	3,7	0	5	3	3	0	7
Totale		2401						322							

MODELLO PER LA VALUTAZIONE E IL MONITORAGGIO DELLE RICHIESTE INAPPROPRIATE DI ESAMI DI LABORATORIO

G-16

Campoli D., Simoni L., Ottomano A.M., Bergonzini G., Carbonieri A.

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche. Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico di Modena.

Scopo del lavoro: Dal 2002 il Dipartimento di Medicina di Laboratorio ha inserito nei propri obiettivi quello della valutazione della appropriatezza degli esami erogati in ambito aziendale. Tra le diverse iniziative intraprese in proposito è stata individuata come area di inappropriata prioritaria e trasversale a tutti i Laboratori la ripetizione di esami senza una adeguata giustificazione clinica.

Materiali e metodi: Un gruppo di lavoro interdipartimentale formato da rappresentanti del laboratorio e dei dipartimenti clinici ha individuato i test da sottoporre a monitoraggio, i rispettivi intervalli di tempo specifici (giorni di validità). Si è poi proceduto alla raccolta dei dati relativamente a un gruppo definito di reparti per pazienti ricoverati in routine o in urgenza. Si sono considerati: ripetuti precocemente i test richiesti prima della scadenza dell'intervallo di tempo specifico; ridondanti i test ripetuti precocemente in presenza di un precedente normale, senza giustificazioni cliniche.

Risultati: Un prima valutazione eseguita nel novembre 2002 con elaborazioni pressoché manuali aveva classificato il 41 % degli esami estratti come ripetuti precocemente; il 52 % di questi presentavano un precedente normale e quindi dovevano essere considerati ridondanti (21 % degli esami considerati). E' stato quindi sviluppato un software per la raccolta dei dati e la valutazione della ripetizione/ridondanza delle richieste in modo completamente automatizzato e personalizzabile di volta in volta. E' infatti possibile selezionare: il reparto/i, l'esame/i, il periodo e le regole di elaborazione. La valutazione può essere preliminare all'esecuzione dell'esame o successiva: in questo caso si confronta il risultato ottenuto con il precedente alla luce di un delta check impostato per la elaborazione.

L'elaborato presenta i casi di ridondanza riscontrati e ordinati per Materiale, Esame, Parametro, Reparto, Medico richiedente, Ipotesi diagnostica, Terapia, Criteri verificati, offrendo quindi tutti gli elementi per una valutazione condivisa con i clinici.

Conclusioni: Riteniamo che lo studio condotto fornisca un'interessante valutazione, basata su criteri oggettivi e condivisi, del livello di inappropriata in termini di richieste di esami ridondanti. Questa valutazione ci è servita per fotografare la situazione al tempo 0 e ha rappresentato il punto di partenza per lo sviluppo di un programma di monitoraggio di tutti i reparti dell'azienda e per la applicazione del modello in modo preventivo sul software di prenotazione informatizzata delle richieste in reparto.

LA TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE: COMPITO DEL MMG O DEI CENTRI FCSA?

G-17

Marcolla A., Orsoni G.

Laboratorio di Patologia Clinica Ospedale di Cles (TN); Dipartimento di Medicina di Laboratorio APSS- Trento

Introduzione. Presso il laboratorio di Patologia Clinica dell'ospedale di Cles è attivo da anni un centro per il monitoraggio della TAO (Terapia Anticoagulante Orale), iscritto all'FCSA dal gennaio 2000, cui afferiscono pazienti del Distretto Valli di Non e di Sole, con bacino d'utenza di circa 52.000 abitanti. Dal 2000 ad oggi l'incremento medio annuale del numero degli aderenti al Centro è stato un po' superiore al 20%.

Scopo del lavoro. Alla fine del 2004 è stato proposto dall'APSS Trentina ai Medici di Medicina Generale (MMG) del Distretto, un progetto obiettivo incentivante (circa 600 euro per ogni MMG aderente) per i pazienti in terapia anticoagulante orale, allo scopo di dirottare su tali medici il maggior numero di pazienti seguiti dal Centro, da Specialisti vari o autogestiti.

Risultati. Dopo otto mesi dalla partenza del progetto, abbiamo voluto capire quali ripercussioni vi siano state sull'attività del Centro FCSA. Nel Distretto analizzato operano 40 MMG dei quali 20 hanno aderito al Progetto. I pazienti che assumono anticoagulanti orali sono circa 800 e tutti gli anni vi è un loro incremento perché studi dedicati hanno indotto a raccomandare tale trattamento in situazioni sempre più numerose. Dal gennaio 2005 soltanto 5 nuovi pazienti iscritti con medici aderenti al progetto sono stati inviati al Centro TAO, mentre ben 106 pazienti dei medici in causa, che erano precedentemente già seguiti dal Centro, hanno scelto di proseguire in tal senso e solo 5 sono passati col medico di base.

Questi i numeri relativi al Centro Tao di Cles nel tempo:

Sono stati seguiti:

- nel 2000 140 pazienti
- nel 2001 176 pazienti (25.7% in più)
- nel 2002 217 pazienti (23.3% in più)
- nel 2003 270 pazienti (24.4% in più)
- nel 2004 322 pazienti (19.2% in più)
- nel 2005 388 pazienti (20.5% in più)

Conclusioni. I dati relativi all'incremento nel numero dei pazienti iscritti al centro FCSA dell'Ospedale di Cles dal gennaio ad oggi (solo 8 mesi) dimostrano una tendenza non diversa dagli anni precedenti. Anche il numero di pazienti che hanno deciso di proseguire col Centro TAO sembra significativo. Per il momento pare che l'obiettivo che l'Azienda Sanitaria si era preposta, sia stato disatteso. Questo, se da un lato ci conforta per gli indubbi riscontri positivi sul nostro operare per i bisogni dell'utenza, dall'altro ci preoccupa visto il costante incremento numerico della popolazione che si rivolge al Centro TAO.

PROGETTO DI PIANIFICAZIONE STRATEGICA DEL DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA CLINICA: LA BALANCED SCORECARD COME STRUMENTO DI GOVERNO AZIENDALE

G-18

Caputo M.*, Milanese B., Tinivella A.*****

* Dip. dei Servizi di Diagnosi e Cura ULSS 22, Regione Veneto ** Dip. di Medicina di Laboratorio A.O. di Desenzano del Garda, Regione Lombardia *** Dip. di Diagnostica ASL 13, Regione Piemonte.

Premessa. La sanità pubblica in Italia ha vissuto a lungo in un ambiente non competitivo. Oggi questo quadro sta cambiando e il servizio pubblico si deve porre nella prospettiva del miglioramento dell'efficacia ed efficienza adottando sistemi di misurazione delle performance quali la BSC.

Scopo. Illustrare una metodologia di lavoro che, attraverso la stesura di una BSC del Laboratorio Analisi, renda possibile presidiare: la prospettiva economico-finanziaria, la capacità di soddisfare e fidelizzare l'utente, la gestione delle relazioni interistituzionali con i principali portatori d'interesse.

Materiali e Metodi. La ricerca di programmazione oggetto del progetto si basa sulle esperienze maturate in tre Dipartimenti di tre Regioni diverse che hanno nel tempo ottimizzato le risorse innescando meccanismi di economia di scala. Consapevoli dell'esigenza di integrare i processi strategici con i processi di programmazione e controllo di gestione si è lavorato allo sviluppo di un adeguato sistema di BSC attraverso quattro fasi: scelta del livello organizzativo, definizione degli obiettivi, definizione delle azioni e degli indicatori, attribuzione di responsabilità, risorse, diffusione.

Risultati. Nella prima fase il Capo Dipartimento ha ottenuto dalla Direzione Aziendale l'autorizzazione a costruire la BSC del Dipartimento. Quindi sono stati convocati i membri del Comitato Direttivo che, basandosi su mission e vision aziendali, fatta l'analisi di scenario per descrivere aree di eccellenza, criticità, aspettative, rischi, hanno definito gli obiettivi. Si sono poi formalizzati quattro sottogruppi di lavoro che hanno stabilito le azioni e gli indicatori da adottare allo scopo di perseguire gli obiettivi "misurandone" il grado di raggiungimento secondo le quattro prospettive: risultato finanziario, soddisfazione del cliente, miglioramento dei processi e dell'organizzazione, risorse umane. Al termine della terza fase si è disegnata la BSC del Dipartimento con definizione delle attività e degli indicatori.

Discussione e conclusioni. Poiché nella sanità pubblica l'obiettivo prioritario non si configura nel produrre profitti, ma tende al miglioramento dello stato di salute dei pazienti, ci è sembrato importante lavorare ad un progetto che consente di ottenere un "valore aggiunto" individuando gli obiettivi futuri, commisurandoli al grado di raggiungimento e permettendo di identificare le risorse adeguate in una prospettiva di continuo aggiornamento delle strategie in sintonia con i cambiamenti.

È POSSIBILE REALIZZARE IL "CONTROLLO DI PRODOTTO" IN UN LABORATORIO POCT? PROPOSTA PER UN PROGRAMMA DI VEQ HOME MADE

H-01

Roncada T., Del Giudice G., Olivotto F., Rocchi A.M.

UOA Laboratorio Analisi Chimico Ciniche e Microbiologia Ospedale di Pieve di Cadore ULSS n.1 Belluno

Scopo del Lavoro. I programmi di VEQ non sono applicabili, se non in minima parte, ai Laboratori POCT. Vi è tuttavia la necessità di tenere sotto controllo l'esecuzione delle analisi ovunque: in un laboratorio centrale, in un laboratorio decentrato o al letto del malato. Il Laboratorio Analisi di Pieve di Cadore presenta tre Laboratori decentrati POCT (LPOCT) con strumentazione di ematologia, coagulazione e chimica, attualmente tenuti sotto controllo mediante materiale fornito dalle ditte. Scopo del presente lavoro è di suggerire un approccio diverso che permetta di confrontare i risultati dei LPOCT con quelli del Laboratorio Centrale (LC) sottoposto a VEQ e di esprimere questo confronto con un indicatore numerico.

Materiali e Metodi. Si prevede di utilizzare come materiali di controllo campioni freschi di sangue intero anticoagulato con EDTA per l'emocromo e con citrato di sodio per la coagulazione; e pool di plasmi raccolti in litio eparina e congelati a -20°C per la chimica. Un campione per emocromo e un campione per PT e aPTT saranno eseguiti presso il LPOCT al mattino e subito consegnati al LC ove saranno ripetuti in doppio, con cadenza definita. Nel LC si eseguiranno 20 determinazioni di ciascun analita di chimica su un pool di plasmi freschi e si calcoleranno media, DS e CV; quindi il pool sarà aliquotato e congelato e la determinazione sarà ripetuta nei LPOCT e nel LC con cadenza definita.

Risultati. I risultati saranno valutati calcolando la deviazione in percentuale (%Dev) e lo Z-score del risultato ottenuto nel LPOCT rispetto al risultato o alla media dei risultati del LC considerato come valore assegnato. Saranno considerati accettabili: % Dev $\leq \pm 15\%$ e Z-score $\leq \pm 3$.

Si utilizzerà come indicatore la percentuale di risultati non accettabili.

Discussione e conclusioni. Per l'ematologia sarebbe possibile aderire al programma VEQ Regionale di Laboratorio, ma con costi maggiori. I problemi inerenti ai tempi di esecuzione degli esami di coagulazione sono stati risolti dando la precedenza all'esecuzione presso il POCT. Per la chimica saranno da valutare la stabilità nel tempo del pool congelato a -20°C e la difficoltà nel trovare un controllo soddisfacente per i marcatori cardiaci.

Con queste modalità, pur con i limiti citati e in attesa che Società Scientifiche, Aziende e Regioni si attivino per promuovere programmi di VEQ dedicati, riteniamo possibile tenere sotto controllo ed allineare i risultati dei LPOCT con il LC.

APPLICAZIONE DI UN SISTEMA GESTIONE QUALITÀ IN UN LABORATORIO POCT**H-02****Roncada T., Del Giudice G., Olivotto F., Rocchi A.M., *Da Ronchi A.**

UOA Laboratorio Analisi Chimico Ciniche e Microbiologia Ospedale di Pieve di Cadore (BL), *Ufficio Qualità ULSS n. 1 Belluno

Scopo del Lavoro. Nel percorso per attivare un Sistema Gestione Qualità (SGQ) secondo la norma ISO 9001:2000 presso il Laboratorio Analisi di Pieve di Cadore (BL) sono stati considerati anche i Laboratori POCT di Auronzo e Cortina, intesi come settori del Laboratorio.

Materiali e Metodi. E' stato definito il programma per la qualità del Laboratorio individuando servizi offerti, clienti e loro esigenze (requisiti), enunciando la mission e la politica della qualità. E' stata disegnata l'organizzazione e sono state definite le responsabilità (organigramma). Sono stati individuati e descritti i processi, dettagliandoli nelle procedure gestionali (PG) e nelle istruzioni operative (IO), utilizzate per il governo dei processi stessi. Sono state definite le attività di autocontrollo, misurazione e monitoraggio, con i criteri di accettazione e gli standard per gli indicatori di qualità. Per i Laboratori POCT si sono dovuti affrontare in modo specifico i seguenti problemi: la formazione di personale non competente ed appartenente ad altro reparto; la definizione dei compiti e delle responsabilità e la loro rintracciabilità; la compilazione di IO sintetiche applicate sulla strumentazione, in aggiunta alle IO complete e dettagliate contenute nel Manuale della Qualità (MQ); la calibrazione, il controllo di qualità (CQI), la verifica esterna di qualità (VEQ), la manutenzione, le registrazioni.

Risultati. E' stato redatto il MQ con PG e IO specifiche per il POCT. Sono stati addestrati 18 infermieri professionali con valutazione finale e verifica periodica annuale delle competenze. E' stata assegnata una password per accedere alle operazioni consentite dal ruolo specifico (infermieri: accettazione ed esecuzione analisi; caposala: esecuzione dei CQI; medici e biologi: validazione, controllo CQI e VEQ). E' registrata l'attività riguardante controlli, manutenzioni, addestramenti e verifica competenze. Per ciascuno analita sono eseguiti CQI con cadenza determinata dalla criticità dell'esame stesso, utilizzando materiali di controllo forniti dalle ditte. Non esiste ancora un programma di VEQ per i POCT: a questo problema stiamo dando una risposta home-made.

Discussione e Conclusioni. Il SGQ prevede che i processi siano individuati e tenuti sotto controllo. In particolare sono critici per un Laboratorio POCT l'addestramento degli operatori, le IO scritte, il CQI, la VEQ. L'assistenza continua del Laboratorio centrale, pur essendo un parametro non configurabile né misurabile, risulta essere un fattore decisivo per la buona qualità di un Laboratorio POCT. Il 19 aprile 2005 il Laboratorio Analisi di Pieve di Cadore ha conseguito la certificazione ISO 9001:2000 anche per il settore POCT analisi decentrate

RILEVAZIONE DELLA FREQUENZA E DELLA TIPOLOGIA DELLE NON CONFORMITÀ NELLA RICHIESTA DI ESAMI DI LABORATORIO PER LA RIDUZIONE DELL'ERRORE PREANALITICO**H-03****Pesente E., Cucchiario F., Bizzaro N.**

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Gemona del Friuli (UD)

Scopo del lavoro. Rilevare la frequenza di errori nella fase preanalitica attraverso l'analisi delle non conformità nelle richieste non urgenti provenienti dai reparti ospedalieri e individuare le opportune contromisure.

Materiali e Metodi. Nel corso dell'anno 2004, il tecnico adibito al controllo delle richieste, registrava quotidianamente le non conformità rilevate su un modulo appositamente predisposto riportante l'elenco delle principali cause di non conformità preliminarmente identificate dal Laboratorio e la procedura adottata in ciascun caso.

Risultati. In 2.944 richieste su 25.295 totali (11.6%), erano presenti delle non conformità. Le cause più frequenti risultavano essere: a) richiesta incompleta (mancanza di dati anagrafici del paziente, dati identificativi del paziente o del reparto, errata marcatura della scheda ottica) (55.3%); b) richiesta non accompagnata dal campione (19.9%); c) etichettatura errata (incongruenza tra campione e richiesta) (8.6%); d) quantità del campione insufficiente (5%); e) campione non correttamente identificato (1%); f) altre cause (10.2%). Le procedure messe in atto dal tecnico sono state: 1) identificazione e risoluzione del problema in loco attraverso l'utilizzo di dati dell'archivio informatico (60%); 2) segnalazione nel referto (25%); 3) segnalazione telefonica al reparto con successiva correzione dei dati incongrui (9%); 4) richiesta di ripetizione del prelievo (4%); 5) restituzione di richiesta e campione incongrui (1%); 6) annullamento della richiesta (0.5%); 7) segregazione del campione (0.5%).

Discussione e Conclusioni. Il presente lavoro ci ha consentito di identificare con precisione le situazioni e le cause di non conformità e di modificare le procedure operative relative alla formulazione delle richieste e alle modalità di identificazione dei campioni, per una maggior efficacia nella prevenzione e risoluzione delle non conformità. Inoltre, in una riunione generale con il personale dei vari reparti, sono state espone le conclusioni del lavoro svolto e sono state fornite indicazioni sulla corretta procedura da seguire per ridurre il più possibile questo tipo di errore pre-analitico che compromette la qualità globale del lavoro svolto dal Laboratorio.

IMPLEMENTAZIONE DI UN MODULO PER LA GESTIONE DELLE NON CONFORMITÀ E DEGLI INDICATORI

H-04

Rulli A., Fulvi S., Canonico F., Martinotti S.

Laboratorio di Patologia Clinica II Ospedale Clinicizzato SS. Annunziata Chieti.

Scopo del lavoro. La gestione delle non conformità da parte del responsabile del Sistema Qualità ai fini dell'elaborazione degli indicatori per il riesame della Direzione è nella nostra esperienza uno tra i punti più critici nel mantenimento di un sistema qualità in una organizzazione già certificata. Da ciò è scaturita la necessità di una azione correttiva per introdurre un nuovo modulo di registrazione delle non conformità e per la registrazione mensile dei dati importanti ai fini dell'elaborazione degli indicatori.

Materiali e metodi. Dalla valutazione del riesame del 2004 scaturiva:

- una discrepanza sul numero di non conformità rilevate nei settori durante le verifiche ispettive e le non conformità effettivamente registrate durante l'anno imputata dagli operatori alla mancanza di tempo per la compilazione dei moduli in uso,

- durante l'analisi dei dati risultava difficoltoso raggruppare per tipologie le non conformità che venivano numerate e trascritte in un report riepilogativo in possesso del RGQ e successivamente rielaborate ai fini degli indicatori per il riesame. Si sono discusse queste difficoltà con gli operatori e si è condivisa la necessità di elaborare dei nuovi moduli per la raccolta delle non- conformità e dei dati significativi per l'elaborazione degli indicatori.

Risultati. Il nuovo modulo per le non conformità si presenta come una griglia che prevede la segnalazione di 7 non conformità per foglio numerate progressivamente con la data, le principali tipologie di non conformità (suddivise in preanalitica, analitica, postanalitica, QCI, VEQ, approvvigionamento, sicurezza e verifica ispettiva interna) e la descrizione con riferimento all'analita, al lotto e al campione, la risoluzione con firma, il riferimento ad eventuale azione correttiva. Il nuovo modulo per il sistema degli indicatori, sviluppato in excel, consta di una parte per la raccolta dati da consegnare ai settori ed una parte per l'elaborazione degli stessi. Il programma utilizzato infatti prevede l'elaborazione dei dati in automatico per il calcolo degli indicatori che saranno allegati al riesame dall'RGQ. Ambedue i moduli vengono raccolti mensilmente.

Discussione e conclusioni. Il nuovo modulo delle non conformità comporterà un risparmio di tempo per la compilazione da parte degli operatori che dovranno solo barrare le voci pre-codificate. Inoltre a fondo pagina è presente una tabella di riepilogo, in formato di cedola, dove il responsabile della qualità riporta il numero di non conformità riferito alla tipologia che verrà archiviata per l'elaborazione ai fini del riesame. La valutazione del nuovo modulo è fissata in occasione del riesame che si terrà per fine anno.

L'AUDIT IN MEDICINA DI LABORATORIO: UNO STRUMENTO PER LA VERIFICA DELL'EFFICACIA CLINICA E DELL'UTILITÀ DEL REFERTO INTERPRETATO.

H-05

Bizzaro N.

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

Scopo dello studio. L'obiettivo della ricerca consisteva nella verifica della efficacia clinica della diagnostica di Laboratorio e del grado di comprensione e di utilizzazione dei commenti interpretativi inclusi nei referti di Laboratorio da parte dei Medici di Medicina Generale (MMG).

Materiali e Metodi. A 94 MMG dell'AULSS n.10 Veneto Orientale, è stato distribuito nell'anno 2002 un questionario che prendeva in esame diversi aspetti relativi alle diagnostiche ematologica, citofluorimetrica e autoanticorpale eseguite nel Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale di S.Donà di Piave (VE).

Risultati. Hanno restituito il questionario 74 MMG (78.7%). Nella diagnostica ematologica, il 96.8% dei partecipanti ritiene che i commenti interpretativi all'emocromo siano molto utili, in particolare quando sono presenti alterazioni della formula leucocitaria. Negli ultimi 10 anni, solo l'8.5% dei MMG ha registrato sporadiche incongruenze nei dati dell'emocromo e, in questo caso, soprattutto nei conteggi piastrinici. In citofluorimetria, il 97% dei MMG si è dichiarato soddisfatto dei dati che gli vengono forniti e il 94.7% ritiene essenziale la presenza del commento interpretativo o delle conclusioni diagnostiche. Nella diagnostica autoanticorpale, il 97% ritiene che i risultati e i commenti siano adeguati ad inquadrare la situazione clinica del paziente; l'89% richiede un commento esplicativo anche per i quadri fluoroscopici più comuni degli anticorpi anti-nucleo e per gli anti-ENA. La strategia diagnostica che prevede l'applicazione delle linee guida GdS-AI SIMeL è condivisa dal 100% degli intervistati e l'88% accetta tempi di risposta più lunghi necessari per il completamento delle indagini. Infine, il 100% si dichiara complessivamente soddisfatto della diagnostica di Laboratorio, non è a conoscenza di errori diagnostici e non registra lamentele da parte dei pazienti.

Conclusioni. Il fornire al MMG un referto in cui accanto ai risultati delle indagini appaiano anche commenti interpretativi con indicazioni sul significato dell'esame e del risultato ottenuto, oltre ad eventuali suggerimenti sulla miglior prosecuzione dell'iter diagnostico, ha un notevole impatto in termini diagnostico-assistenziali e di soddisfazione sia del MMG che del paziente.

VALUTAZIONE DEL REFERENCE CHANGE VALUE (RCV) QUALE INDICE DI REFERTAZIONE DI ALCUNI TEST DI LABORATORIO

H-06

Brescia V., Martinelli R., Losito A., Urso G., Cassano V., Pansini N.

Laboratorio di Patologia Clinica I - Policlinico di Bari

Scopo del lavoro: valutare l'utilità nella routine di laboratorio di un parametro statistico indice di variabilità tra due misurazioni di un analita in un singolo paziente.

Materiali e metodi: il RCV permette di valutare se la differenza nei termini numerici di due risultati è maggiore rispetto alla somma della variabilità intrinseca dei risultati stessi: $RCV = 2^{1/2}Z(CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$. Sono stati studiati 9 analiti (AFP, CA125, CA15.3, CA19.9, CEA, PSA, cPSA, Ferritina, Prolattina) in base alla disponibilità in letteratura dei dati del CV_I (Variabilità Biologica Intraindividuale) ed alla opportunità di utilizzare la "probabilità" di una variazione del dato rispetto lo scostamento dai valori di riferimento. Per il calcolo del RCV è stato selezionato lo Z score con probabilità altamente significativa (99%) e l'approccio bidirezionale RCV(b) e unidirezionale RCV(u). Il CV_A (variabilità analitica) è stato ricavato dai risultati dei programmi di CQI del laboratorio ad un livello decisionale prossimo ai valori di riferimento; il CV_I dalla bibliografia (1). Questi dati sono stati inseriti nel modulo di refertazione.

Risultati: i valori del RCV(u) sono stati forniti nella refertazione come indice di significatività della variabilità intraindividuale (monitoraggio): AFP 43.20%; CA125 43.20%; CA15.3 15.7%, CA19.9 51.8%, CEA 19.9%, PSA 35.2%, cPSA 29.3%, Prolattina 18.0, Ferritina 31.28%. I valori del RCV(b) sono stati utilizzati per calcolare i valori "critici" intesi come variabilità intrinseca ai limiti di riferimento (validazione analitica) [AFP: v.riferimento 0-10 ng/ml, v.critico 14.3 ng/ml; CA 125: v.riferimento 0-30 U/ml, v.critico 38.3 U/ml; CA 15.3: v.riferimento 0-32 U/ml, v.critico 37.0 U/ml; CA 19.9: v.riferimento 0-30.9 U/ml, v.critico 47.0 U/ml; CEA: v.riferimento 0-5 ng/ml, v.critico 6.0 ng/ml; PSA: v. riferimento 0-4 ng/ml, v.critico 5.4 ng/ml; cPSA: v. riferimento 0-3.6 ng/ml, v.critico 4.6 ng/ml; Prolattina: v.riferimento non gravid. 2.8-29.2 ng/ml, v.critico (basso) 2.3 ng/ml, v.critico (alto) 34.5 ng/ml; Ferritina: v.riferimento 22-322 ng/ml, v.critico (basso) 15.1 ng/ml, v.critico (alto) 422.9 ng/ml].

Conclusioni: la disponibilità di un ulteriore indice statistico (RCV) può risultare utile al clinico per una corretta interpretazione della differenza tra risultati ottenuti durante il monitoraggio della malattia a medio e lungo termine. Nel laboratorio è sicuramente di ausilio per migliorare l'efficacia della validazione tecnica e clinica e fornisce uno stimolo per un costante miglioramento della qualità analitica.

(1) Ricos C, et al. Current databases on biologic variation: pros, cons, and progress. www.westgard.com/guest17.htm

INFLUENZA DELLA TEMPERATURA DI CENTRIFUGAZIONE DEL CAMPIONE SUI DOSAGGI COAGULATIVI

H-07

Salvagno G.L., Lippi G., Guidi G.C.

Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Università di Verona

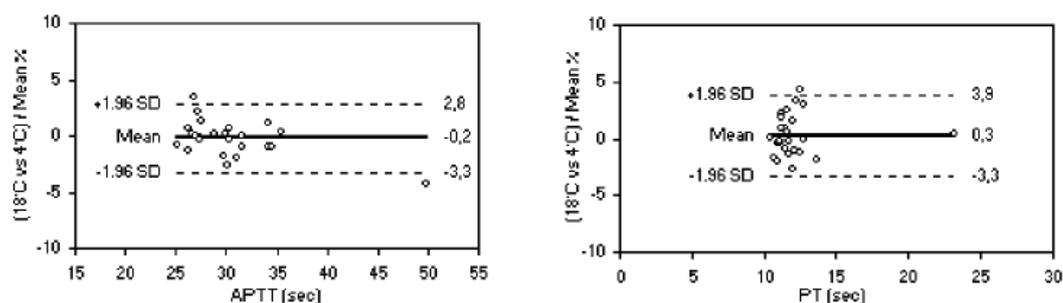
Scopo del lavoro. Secondo le recenti indicazioni NCCLS, la centrifugazione dei campioni per test emocoagulativi dovrebbe essere eseguita a temperatura ambiente. Scopo dello studio è valutare differenze tra la tradizionale temperatura di centrifugazione (4°C) e quella raccomandata dal protocollo NCCLS H21-A3.

Materiali e Metodi. 30 campioni di sangue, raccolti direttamente in provette siliconate con 0.105 mol/l citrato trisodico tamponato, sono state centrifugati alternativamente a 4°C e 18°C ed analizzati per tempo di protrombina (PT) e tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT) su strumento BCS con Thromborel S per PT e Pathromptin SL per APTT.

Risultati. La variazione dei risultati in funzione della temperatura di centrifugazione è raffigurata con diagramma di Bland & Altman. Le variazioni sono comprese entro le specifiche di qualità per il bias desiderabile ($\pm 2.0\%$ PT; ± 2.3 APTT). La media dei valori ottenuti con centrifugazione a 4°C e 18°C non differisce significativamente (PT: 12.2 ± 2.4 vs 12.1 ± 2.4 sec, $p=0.391$, $r=0.996$; APTT: 30.3 ± 4.7 vs 30.4 ± 5.1 sec, $p=0.314$, $r=0.997$).

Discussione e conclusioni. Malgrado il protocollo NCCLS H21-A3 raccomandi centrifugazione a temperatura ambiente, centrifugazione a 4°C non genera significativi bias clinico-analitici nei parametri esaminati.

Diagramma di Bland & Altman per PT ed APTT in campioni centrifugati a 4°C o 18°C



EFFETTO DELLA TEMPERATURA DI CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE NELLA DETERMINAZIONE DELLA PROTEINA S-100

H-08

Dorizzi RM., Meneghelli S., Rocca M., Massocco A., Nicolis D., Cremonese E., Rizzotti P.

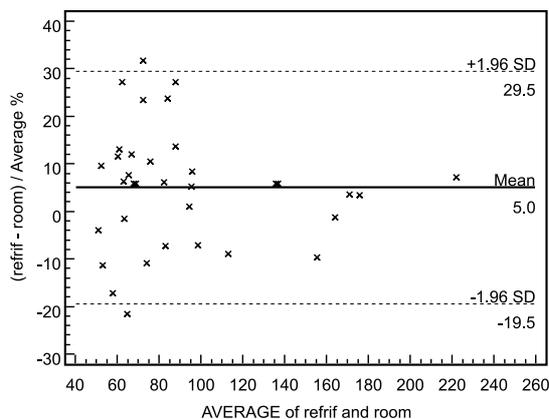
Laboratorio Analisi, OCM, AO Verona

Scopo del Lavoro. La concentrazione sierica di proteina S-100 viene misurata dal 1998 nei pazienti in follow-up per melanoma e nei pazienti con grave danno neurologico. La logistica molto complessa della nostra azienda ha reso necessario condurre uno studio per confermare l' idoneità del campione raccolto e conservato a temperatura ambiente (T.AMB).

Materiali e Metodi. La concentrazione di Proteina S100 è stata misurata in 35 campioni di siero raccolti in ambulatorio. Una aliquota è stata conservata per 6-8 ore a temperatura ambiente ed una a + 4 °C per non più di 60 minuti. Il siero è stato poi conservato a - 20 °C fino al momento dell' analisi che è stato effettuata con l' analizzatore Liaison (Diasorin, Saluggia).

Risultati. La figura mostra il Bland-Altman plot dei risultati ottenuti nelle due condizioni di conservazione. coefficiente di correlazione: r= di 0.972 (95% i.c.=0.945-0.986); e la regressione di Passing Bablok è risultata: T.AMB=-3.710 + 0.987 +4 °C.

Discussione e conclusioni. I nostri risultati confermano quanto riportato da Raabe et al (Clin Chem Lab Med 2003). La determinazione della proteina S-100 può essere eseguita su campioni conservati a temperatura ambiente e non porta a risultati sostanzialmente diversi.



VALORI DI RIFERIMENTO PER LA VELOCITÀ DI ERITROSEDIMENTAZIONE CORRETTA PER LA CONCENTRAZIONE DI GLOBULI ROSSI (Σ-VES)

H-09

Pizzolato U., Giavarina D., Capuzzo S., Fabbi F., Soffiati G.

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

Scopo del Lavoro. Calcolare l' intervallo di riferimento della VES e della Σ-VES con metodo indiretto, comparando i risultati con gli intervalli in uso pubblicati in letteratura.

Materiali e Metodi Per la stima degli intervalli di riferimento sono stati considerati i risultati di VES ottenute da pazienti ambulatoriali nel periodo di due anni, presso il nostro laboratorio. Un totale di 47.810 risultati sono stati analizzati per età e sesso. La stima degli intervalli di riferimento è stata ottenuta secondo il metodo indiretto di Kairisto. Questo metodo si basa sull' assunto che la maggior parte dei risultati prodotti dal laboratorio proviene da soggetti non affetti da malattia e ipotizza che la moda della distribuzione di frequenza di tutti i dati sia la stessa della eventuale popolazione di riferimento. In questa procedura, ciascun lato della distribuzione di frequenza è considerato come mezza distribuzione gaussiana, con la stessa moda e la stessa frequenza di moda, ma con differente deviazione standard. Il metodo è stato applicato con il software GraphRoc.

Risultati. **Tabella I.** Intervalli di riferimento per VES e Σ-VES

Età(anni) sesso	Intervalli di riferimento pubblicati ³⁹			VES		Σ-VES	
	2.5° percentile	97.5° percentile	n	2.5° percentile	97.5° percentile	2.5° percentile	97.5° percentile
<14	2	34	3549	2	33	2	41
14-50F	2	37	10164	2	34	5	46
14-50M	2	28	7158	1	28	9	37
50-70F	2	39	9437	4	46	8	61
50-70M	2	37	6861	2	30	9	49
>70	3	46	10641	4	61	10	71

Conclusioni. Il confronto tra intervalli di riferimento e quelli calcolati in accordo con le raccomandazioni IFCC e ICSH mostrano una buona concordanza in tutti i gruppi per età considerati, con eccezione di quello superiore ai 70 anni. I valori di riferimento risultano aumentati per la Σ-VES rispetto alla VES. Questo è un risultato atteso, essendo la maggior parte dei campioni normalmente analizzati in laboratorio con un HCT > di 0.35 e quindi con una VES "sottostimata". Esula da questo lavoro la valutazione se e quanto la Σ-VES sia più "diagnostica" della VES. Se fosse introdotta, necessiterebbe necessariamente di nuovi intervalli di riferimento. Gli intervalli di riferimento proposti sono stati ottenuti da una popolazione ampia di riferimento ed è nostra opinione che essi possono essere la base per una corretta classificazione di tutti i pazienti al sotto a 70 anni.

TEMPO DI PROTROMBINA: CONFRONTO TRA DIVERSI REAGENTI**H-10****Paoletti O., Alatri A., Morstabilini G., Denti N., Martellenghi E., Medagliani MA., Testa S.**

Centro Emostasi e Trombosi, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, A.O. Istituti Ospitalieri di Cremona

Il tempo di Protrombina (PT) è il test di laboratorio utilizzato per monitorare i pazienti in trattamento con farmaci anticoagulanti orali. Per superare il problema della notevole variabilità dei risultati del PT tra i diversi laboratori, è stato introdotto e validato il sistema INR (International Normalized Ratio) per l'espressione dei risultati. Per tale motivo, tutti i reagenti utilizzati dovrebbero venire calibrati in modo da fornire identici risultati.

Scopo del Lavoro: confrontare i risultati di PT INR e di PT Ratio ottenuti con il sistema STA-R Diagnostica Roche in uso c/ o il Laboratorio dell'Ospedale di Cremona, utilizzando cinque diversi reagenti commerciali.

Materiali e Metodi: Sono stati prelevati campioni di sangue venoso in sodio citrato da 80 pazienti in TAO con diversa intensità di anticoagulazione e da 20 controlli ottenuti da volontari sani non in TAO. I campioni sono stati centrifugati a 3000 g.p.m. per 10 minuti e successivamente analizzati con il sistema STA-R utilizzando in sequenza i 5 diversi reagenti commerciali.

- Analizzatore automatico magneto meccanico STA-Rack Diagnostica Stago Roche

- Neoplastin Plus (Stago Paris, France) ad ISI=1.23, della ditta Roche

- Tromboplastin S (Dasit, Italy) ad ISI=1.68

- Recombiplastin (IL) ad ISI=0.88

- Neoplastine CI (Roche) ad ISI=1.81

- Helena (Manchester Reagent) ad ISI=1.6

L'analisi è avvenuta dopo ricalibrazione dell'ISI mediante plasmi ricalibranti forniti dalla ditta Dade Bering.

Per il confronto dei risultati sono stati calcolati i coefficienti di correlazione e le rette di regressione lineare; per la rappresentazione grafica è stata utilizzata la metodica descritta da Bland & Altman.

Risultati: Per quanto riguarda il confronto degli INR si sono ottenuti coefficienti di correlazione compresi tra 0.82 e 0.98. La migliore correlazione si è evidenziata tra la Neoplastin Plus e Roche Alto, entrambe della ditta Roche. Nel caso del PT Ratio i coefficienti di correlazione sono risultati tutti superiori a 0.90. La metodica di Bland & Altman, sia nel caso del PT INR che PT Ratio ha evidenziato una scarsa concordanza dei risultati ed una notevole dispersione dei valori attorno alla media delle differenze, come si evince dagli intervalli $d \pm 2s$. La migliore concordanza è emersa dal confronto tra Neoplastin e Roche Alto. La discrepanza tra i dati aumenta all'aumentare dei valori di INR.

Conclusioni: i risultati del nostro studio evidenziano uno scarso allineamento dei valori di INR e PT Ratio ottenuti con diversi reagenti disponibili in commercio. Tale discrepanza aumenta all'aumentare dei valori di INR ed il bias analitico raccomandato (≤ 0.20 unità di INR) non viene rispettato nella maggior parte dei casi. Ricordiamo che nella pratica clinica si considera accettabile una differenza di INR entro ± 0.5 per la conseguente variazione prescrittiva della terapia dei farmaci anticoagulanti. Questi dati sembrano indicare una non completa standardizzazione della metodiche di calibrazione adottate. Sarebbero auspicabili ulteriori lavori collaborativi tra aziende ed utilizzatori al fine di migliorare la concordanza dei risultati.

SORVEGLIANZA DEI PAZIENTI PEDIATRICI IN DIALISI PERITONEALE CON STRUMENTAZIONE EMATOLOGICA**H-11****Da Vela G., Bertino M., Salvadori M., Schiatti R.**

Laboratorio Analisi Azienda Meyer, Firenze

Scopo del lavoro: La dialisi peritoneale viene frequentemente impiegata in ambito pediatrico, al fine di garantire un'adeguata terapia ed una buona qualità di vita nei piccoli pazienti con grave insufficienza renale. Per ottenere la massima efficacia in tale ambito è necessaria una continua sorveglianza del sistema dal punto di vista flogistico, poiché l'instaurarsi di un'infezione e di un'infezione altera profondamente la permeabilità del peritoneo. Il controllo delle infiammazioni e delle infezioni è attuato con parametri ematici (Proteina c-reattiva, VES, conteggio neutrofili) e con il conteggio dei leucociti nel liquido di dialisi in diversi momenti della dialisi. Il nostro scopo è stato quello di automatizzare quest'ultima fase, rendendola indipendente dall'operatore e migliorandone le caratteristiche analitiche.

Materiali e Metodi: Al laboratorio vengono inviati due contenitori sterili da urinocoltura contenenti ciascuno un'aliquota di scarico del dialisato, ad inizio scarico e a scarico totale; ogni campione è accompagnato da una richiesta diversa con proprio barcode. Dopo alcune prove preliminari per i conteggi leucocitari, utilizzando lo strumento degli emocromi (ADVIA 120 *Bayer), è stato deciso di utilizzare il metodo per il liquido cefalo-rachidiano, che prevede una prediluizione del campione con un reagente dedicato (Advia 120 CSF *Bayer).

Dal 10/6/4 al 10/6/5 sono giunti al laboratorio 124 campioni per i conteggi leucocitari e di questi 34 campioni sono stati misurati sia con la strumentazione ematologica sia con letture al microscopio; le letture microscopiche sono state eseguite sempre dallo stesso operatore e sempre entro un'ora circa dall'arrivo dei campioni,

Risultati: tutti i pazienti esaminati col metodo microscopico e col metodo strumentale mostrano una buona concordanza. In particolare si apprezza una leggera sovrastima del metodo strumentale rispetto alla lettura al microscopio ottico. La lettura automatizzata, quando il numero dei leucociti supera la soglia di 50/microlitro, consente una buona separazione delle popolazioni cellulari, fornendo percentuali utili alla gestione del paziente. Come esempio citiamo il caso del bambino che, durante una vacanza al mare, ha subito un'infezione del neostoma addominale, che ha alzato i conteggi cellulari a valori superiori a 100/microlitro, con una quota di neutrofili di circa 85% e positività delle esterasi leucocitarie su striscia.

Discussione e Conclusioni: In conclusione riteniamo di aver migliorato la qualità del referto nei liquidi di dialisi peritoneale, utilizzando strumentazione presente in laboratorio, per poter offrire ai piccoli pazienti un controllo più completo, rapido ed indipendente dall'operatore.

UTILIZZO DEL BNP PER IL MONITORAGGIO DEI PAZIENTI AFFETTI DA SCOMPENSO CARDIACO IN TERAPIA ANTICOAGULANTE ORALE A LUNGO TERMINE

H-12

Spotti GE., Alatri A., Paoletti O., Tozzi A., Beati MC., Casalini L., Testa S.

Centro Emostasi e Trombosi, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, A.O Istituti Ospitalieri di Cremona.

Introduzione. I livelli plasmatici dell'ormone natriuretico di tipo B (BNP) aumentano in relazione alla compromissione della funzione di pompa del ventricolo sx. Pertanto il BNP può essere un indicatore diagnostico molto sensibile e specifico di scompenso cardiaco nei suoi vari stadi, consentendo la diagnosi differenziale con altre patologie dal quadro clinico similare (come ad es. le dispnee di tipo respiratorio).

Scopo del lavoro. Valutare il dosaggio del BNP in pazienti afferenti presso un centro di sorveglianza della TAO affetti o meno da scompenso cardiaco noto.

Materiali e Metodi. Sono stati arruolati 100 pazienti consecutivi in TAO per differenti indicazioni cliniche (fibrillazione atriale: 60; trombosi venosa profonda e/o embolia polmonare: 19; protesi valvolari cardiache: 11; altre indicazioni: 10). Come gruppo di controllo sono stati utilizzati 50 donatori di sangue. I pazienti con valori di creatinina >1,5 sono stati esclusi dalla valutazione. Per il dosaggio del BNP, è stato utilizzato un metodo immunoenzimatico a cattura di microparticelle (MEIA) mediante analizzatore AxSYM (Abbott, Roma). L'analisi, effettuata su campioni di plasma in EDTA, è stata eseguita entro 2 ore dal prelievo. È stato assunto un livello decisionale pari a ≤ 100 pg/ml corrispondente al 90% dei valori della popolazione normale studiata.

Risultati. Cinquantacinque dei 58 pazienti (94.8%) con scompenso cardiaco avevano un BNP positivo; i restanti 3 (5.2%) avevano valori di BNP fra 80 e 100 pg/ml. I valori di BNP registrati sono risultati direttamente proporzionali alla gravità del quadro clinico, classi NYHA e quadro ecocardiografico. Sette dei 42 pazienti (15%) senza scompenso, presentavano un BNP positivo. In tutti i casi si trattava di pazienti con patologie condizionanti ipertensione polmonare (Embolia Polmonare e BPCO). Il BNP nella popolazione di controllo è risultato sempre inferiore ai valori di cut-off calcolato (media 27.98, min= 0 max= 71.71).

Conclusioni. I risultati confermano l'utilità del BNP nella diagnosi dello scompenso cardiaco e nel determinarne la prognosi. I valori elevati riscontrati nel gruppo di pazienti senza scompenso cardiaco sono risultati tutti associati ad una condizione di ipertensione polmonare e cuore polmonare cronico, potenziale causa di scompenso. È in corso un follow-up di questi pazienti per valutare il valore predittivo del BNP come marker precoce di scompenso cardiaco.

VALUTAZIONE PREANALITICA DEL CAMPIONE: CONFRONTO TRA DUE METODI APPLICATI SU DIMENSION

H-13

Lo Cascio C., Pretto A., Soldati M., Mainardi R., Cocco C., Rizzotti P.

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, OCM, Verona

Scopo del lavoro. Sull'analizzatore Dimension RXL (Dade Behring,) abbiamo confrontato il metodo per la valutazione degli indici del siero HIL con uno home-made, denominato XQS.

Materiali e metodi. XQS esprime i risultati con un indice da 1 a 3 in cui X (determinato dalla differenza di assorbanza a 452nm e 700nm) rappresenta l'ittero, Q (differenza tra 405nm e 383nm, con correzione se la assorbanza 452nm-700nm è molto superiore) l'emolisi, S (340nm - 383nm) la lipemia. HIL attribuisce agli indici H emolisi (dato dalla differenza tra assorbanza a 405nm e 700nm), I ittero (differenza 452nm e 700nm) e L lipemia (lettura a 700 nm) un valore da 1 a 6. Bilirubina e trigliceridi sono stati misurati con il metodo in uso sullo strumento (TBIL e TGL, Dade Behring,), l'emoglobina sull'analizzatore per ematologia Sismex XE2100 (Dasit).

Risultati. Dall'esame di 699 campioni provenienti dalla routine, 596 risultano negativi per entrambi i metodi e 103 (15%) positivi, di questi 2 sono positivi solo per XQS e 68 solo per HIL. Analizzando le singole positività si nota che 25 (3.6%) segnalano emolisi; in tutti H è positivo, in 12 anche Q; dei non concordanti 1 è una mancata segnalazione di XQS in un campione fortemente itterico, 4 presentano lieve emolisi non rivelata da Q, 7 sono false positività di H in campioni itterici. La bilirubina viene segnalata in 50 campioni (7%) di cui 1 è positivo solo per X (errore per positività multipla di XQS) e 28 deboli positività sono segnalate solo da I Lipemia: 54 positività totali (8%) di cui 3 S+ due dei quali L -, uno per errore di XQS con positività multiple, l'altro per sottostima di L in un campione cremoso; gli altri non concordanti sono deboli positività di HIL che non sono giustificate dalla presenza di trigliceridi. Utilizzando campioni come tali e con diluizioni scalari degli interferenti, abbiamo analizzato la corrispondenza tra concentrazione approssimativa dell'interferente e indice, riscontrando che HIL ha un comportamento lineare e in sostanziale accordo con quanto dichiarato dalla ditta per l'emolisi, dà maggiori positività dell'atteso per quanto riguarda la bilirubina (+ a partire da 20 μ mol/L) mentre presenta un comportamento molto variabile e poco accurato nella lipemia, non essendoci linearità di risposta con la concentrazione dei trigliceridi e risultando positivo anche per campioni con trigliceridi molto bassi

Discussione e conclusioni. Si può affermare che HIL ha una maggiore sensibilità e ampiezza di risposta, utile nella rivelazione dell'emolisi, ma eccessiva per gli altri parametri. Entrambi gli indici, inoltre, non sono attendibili in presenza di positività multiple, in particolare in presenza di ittero HIL sovrastima l'emolisi mentre XQS potrebbe sottostimarla.

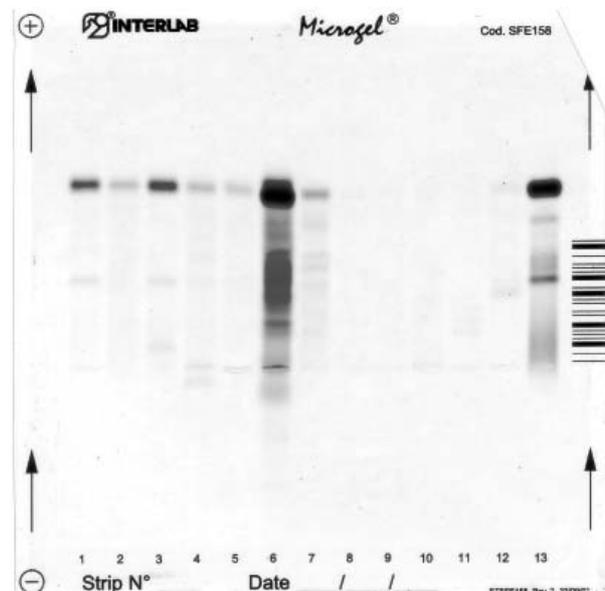
ELETTROFORESI DELLE PROTEINE URINARIE IN ALTA RISOLUZIONE: CONFRONTO TRA DUE METODI

H-14

Bruno F.*, Ramundo FR., Visconti U.**, Ruggeri M.***

*Azienda Ospedaliera S. Giovanni Addolorata, **Interlab S.r.l.

Scopo del lavoro. Confronto tra due metodi per elettroforesi delle proteine urinarie su gel d'agarosio in alta risoluzione ottenuti con il Microgel (Interlab, Roma, Italia) (fig1), strumento completamente automatico, e con l'Hydrasys (Sebia Issy-les Moulinaux, Francia), strumento semi-automatico.



Materiali e metodi. Sono stati analizzati 34 campioni di urina 24h normali e patologici. Erano noti: diuresi, proteine totali, (TCA), albumina, alfa 1 microglobulina, alfa 2 macroglobulina, IgG, catene leggere totali e libere (immunonefelometria). La colorazione dei gel è stata effettuata con Violetto Acido. I tracciati sono stati ispezionati visivamente per individuare i vari tipi di proteinuria (fisiologica, glomerulare, tubulare, mista, da iperafflusso).

Risultati. La risoluzione dei tracciati ottenuti con le due metodiche ha permesso il riconoscimento di vari quadri patologici sia quando le bande erano ben differenziate (proteinurie miste), sia nei casi in cui le bande differivano per variazioni minime di mobilità elettroforetica (presenza confermata da IFE di catene leggere libere, anche polimerizzate).

Conclusioni. Dal confronto dei risultati emerge che entrambi i metodi hanno le stesse prestazioni separative, permettendo di ottenere le medesime informazioni diagnostiche.

VALUTAZIONE ANALITICA E GESTIONALE DI UN GLUCOMETRO PORTATILE

H-15

Camilot L., Morandini M., Ferrai G., Toffolutti M., Cappelletti P.

Laboratorio di Patologia Clinica, AOSMA, Pordenone

Premessa: l'introduzione dei glucometri portatili nella nostra Azienda Ospedaliera, ci ha portato a valutare l'affidabilità e praticità di uno strumento utilizzabile sia nei Servizi Ambulatoriali, sia nei reparti di degenza al letto del paziente (NPT, POCT) per il monitoraggio e controllo della terapia del diabete mellito.

Scopo del lavoro: valutazione delle prestazioni analitiche e della praticabilità del glucometro portatile ACCU-CHECK Inform®, ROCHE DIAGNOSTICS.

Materiali e Metodi: a 190 pazienti del Servizio di Diabetologia è stata determinata la concentrazione di glucosio su sangue capillare con 3 glucometri portatili dello stesso modello. Il metodo enzimatico utilizzato dal glucometro, è basato sul principio della glucosio deidrogenasi con rilevazione amperometrica della differenza di potenziale provocata dalla reazione di ossidoriduzione, che risulta essere proporzionale alla concentrazione di glicemia. Lo strumento utilizza strisce reattive e un chip codificatore dedicato, che permette di eseguire la calibrazione delle funzioni in base alle strisce reattive in uso, e il controllo di qualità si esegue su 2 livelli (Basso e Alto) di concentrazione di glucosio. L'accuratezza del metodo è stata valutata come confronto con il metodo enzimatico esochinasi di ADVIA1650 Bayer®. È stata valutata l'imprecisione intraassay con 20 ripetizioni di 4 campioni a diverse concentrazioni; e l'imprecisione interassay secondo il protocollo NCCLS EP5-A. La linearità è stata valutata con diluizioni scalari tra 350 e 20 mg/dL.

Risultati: confronto con il metodo di riferimento $y=0.959x+4.284$ ($r=0.959$); confronto tra i 3 glucometri: 1vs2 $y=0.967x+4.29$ ($r=0.994$), $p=0.865$; 1vs3 $y=0.970x-4.44$ ($r=0.991$), $p=0.895$; 3vs2 $y=1.03x-4.80$ ($r=0.989$), $p=0.970$; imprecisione intraassay: CV% 2.3(DS 2.2) a 94.5mg/dL; imprecisione interassay: CV% 3.9(DS2.5) a 63.3mg/dL, 3.0(DS3.1) a 104.3mg/dL, 2.9(DS3.6) a 124.3mg/dL, 3.1(DS4.4) a 141.2mg/mL; linearità $r^2=0.999$; errore totale % da 7.03 a 11.4 per valori da 66mg/dL a 142mg/dL.

Conclusioni: da un punto di vista analitico, la nostra valutazione è migliore di quella recentemente pubblicata (Clin Chim Acta2005;353:127-31). Il glucometro centra i goal di errore totale suggeriti sulla base delle specifiche di qualità più recenti (Clin Chem2001;47:67-73) e derivanti dalla variabilità biologica (Scand J Clin Lab Invest1999;59:491-500), ma non quello della American Diabetes Association (Diabetes Care1996;19:S62-6). La tecnologia POCT di ACCU-CHECK Inform è affidabile e di semplice gestione, e permette di migliorare sensibilmente l'outcome del paziente in ambiente ambulatoriale ospedaliero sotto il profilo della maggiore soddisfazione del paziente perché non deve sottoporsi a ripetuti prelievi venosi e della migliorata performance assistenziale.

VALUTAZIONE ANALITICA PRELIMINARE DI DUE METODI PER IL DOSAGGIO DEL MARCATORE CA 19.9

H-16

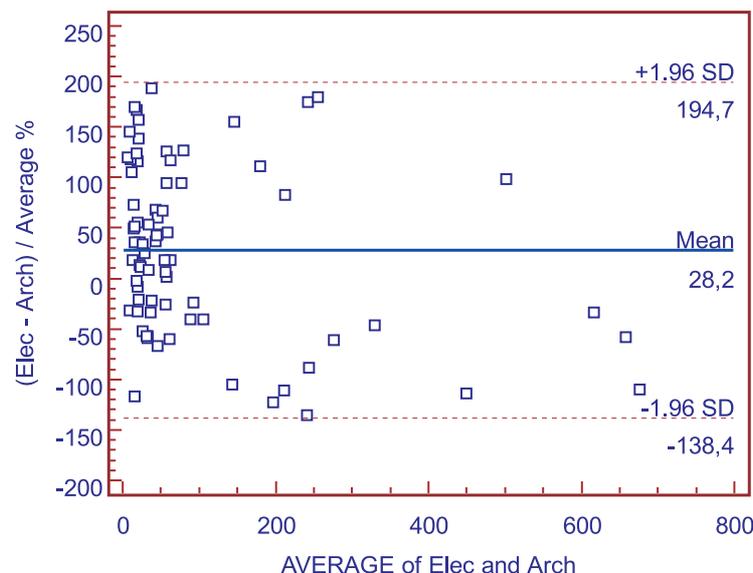
Miconi V.[°], Dittadi R.^{°°}, Caberlotto L.^{°°°}

[°]Laboratorio Analisi, Ospedale di Arzignano (VI), ^{°°}Laboratorio Analisi, Ospedale Civile di Venezia, ^{°°°}Laboratorio Analisi, Ospedale Cà Foncello di Treviso

Scopo del lavoro. E' stata condotta una valutazione preliminare di due metodi di dosaggio del marcatore tumorale Ca19.9: metodo Abbott per Architect confrontato con metodo Roche per Modular E170.

Materiali e metodi. Il confronto è stato condotto su 75 campioni di siero ricavati dalla routine.

Risultati. La regressione secondo Passing-Bablock ha dato i seguenti risultati:



Architect=-15,40 + 1,36E170. Il plot secondo Bland-Altman è riportato in figura.

Discussione e conclusioni. I dati di regressione mostrano una sovrastima pari a circa il 40% di Architect rispetto a Mod/E170. Il plot secondo Bland-Altman evidenzia un bias medio del 16% dovuto in buona parte ad una sovrastima di Architect per concentrazioni fino a 15 U/mL. Utilizzando un cut-off pari a 37 U/mL, 21 campioni sono stati interpretati in modo discordante (15 positivi per Modular E170 e negativi per Architect). Il CA19.9 è un marcatore con caratteristiche di grande dipendenza dal metodo di dosaggio. Anche questa esperienza preliminare conferma che i due metodi in esame presentano differenze di concentrazioni misurate ampiamente disperse in un ambito compreso tra -140% e +190%, senza apparente correlazione con i valori assoluti.

VALUTAZIONE DI UNA METODICA PER LA DETERMINAZIONE DELLA PROTEINA C REATTIVA AD ALTA SENSIBILITÀ

H-17

Malatesti V., Leoncino S., Intra F.

S.C. laboratorio Analisi - Ospedale Evangelico Internazionale Genova

Scopo del lavoro: Le malattie cardiovascolari sono la causa più frequente di mortalità e morbilità nei Paesi Occidentali; prevalentemente sono di origine aterosclerotica e comprendono: la cardiopatia ischemica e le malattie cerebrovascolari. Scopo del lavoro è quello di valutare l'utilità della proteina C reattiva ad alta sensibilità (hs-PCR) e della mieloperossidasi, nella prevenzione e nella valutazione del rischio cardiovascolare.

Materiali e metodi: Si è valutata una casistica di 54 soggetti nella fascia di età tra i 40 e i 60 anni, apparentemente sani ma con valori patologici dell'assetto lipidico (colesterolo totale > 220 mg/l; colesterolo LDL > 130 mg/dl; trigliceridi > 150 mg/dl).

	Unità di misura	MPXi Elevato	MPXi Basso
Età	Anni	51 ± 10,3	49 ± 10,5
♂	-	66%	59%
♀	-	34%	41%
hs - PCR	mg/l	1,62 ± 0,88	1,56 ± 0,73
Leucociti	x10 ³ /μl	8,1 ± 2,9	7,4 ± 2,7
Colesterolo totale	mg/dl	274	266
Colesterolo LDL	mg/dl	143	132
Trigliceridi	mg/dl	302	298

Tutti sono stati testati per la hs-PCR su @Olympus ed è stato calcolato l'indice di Mieloperossidasi (MPXi) su sistema ADVIA 120 @Bayer. Si sono testati 25 soggetti con valori lipidici nella norma come popolazione di controllo.

Risultati: vedi Tabella.

Conclusioni: Si è osservato che sia la hs-PCR e l' MPXi correlano alla gravità della dislipidemia. Data la casistica limitata sarà utile completare i dati preliminari prodotti con test EIA per la PCR ad alta sensibilità ed un dosaggio quantitativo della Mieloperossidasi.

COULTER LH500 E COULTER LH750: DUE SISTEMI A CONFRONTO**H-18****Fusco I.*, Rizzuti G.*, Iordache L.*, Malgeri U.***, Durzini O.****

*Laboratorio Analisi Ospedale Misericordia e Dolce, USL 4 Prato; ** Instrumentation Laboratory

Scopo del lavoro. Verificare la sovrapponibilità dei conteggi cellulari e dei dati di ricerca eseguiti con Coulter LH500 rispetto a Coulter LH750 da noi utilizzato in routine.

Materiali e Metodi. LH500 esegue i conteggi cellulari con tecnologia AccuCount, la Formula (allo stato nativo) e i RET (pretrattati con Nuovo Blu di Metilene) con Tecnologia VCS (Volume, Conduttività - grandezza/densità nucleo, rapporto nucleo/citoplasma, Scatter laser - granularità cellulare). Sui campioni con formula fornisce 24 dati di ricerca, i Parametri Posizionali (PP), che esprimono Media (M) e Deviazione Standard (SD) dei leucociti per Volume, Conduttività e Scatter. Studi clinici (Piccinini C., ISLH 2004) dimostrano che su LH750, la loro variazione corrisponde ad anomalie morfologiche ed è ripetibile all'interno della stessa patologia. Abbiamo analizzato 100 emocromi normali, privi di flag morfologiche o definitive, e 200 patologici.

Risultati.

	NORMALI	
WBC	Y=0.93x+0.12	R=0.99
RBC	Y=1.03x-1.04	R=0.99
HGB	Y=0.99x-0.05	R=0.99
HCT	Y=1.02x-1.18	R=0.99
MCV	Y=0.97+2.22	R=0.98
MCH	Y=0.92+2.11	R=0.97
PLT	Y=1.08x-9.76	R=0.99
NE%	Y=0.98x+0.73	R=0.99
NE #	Y=0.94x+0.03	R=0.99
LI%	Y=0.99x+0.51	R=0.99
LI#	Y=0.93x+0.06	R=0.99
MO%	Y=0.90x+0.82	R=0.95
MO#	Y=0.88x+0.04	R=0.96
EO%	Y=0.93x-0.18	R=0.94
EO#	Y=0.88x+0.01	R=0.91
RET%	Y=1.27x+0.49	R=0.92
RET#	Y=1.09x+0.03	R=0.86

	PATOLOGICI	
WBC	Y=0.94x+0.34	R=0.99
RBC	Y=0.99x+0.03	R=0.99
HGB	Y=0.99x-0.14	R=0.99
HCT	Y=0.99x-0.26	R=0.99
MCV	Y=0.99x+0.53	R=0.99
MCH	Y=0.99x+0.37	R=0.99
PLT	Y=1.05x+8.9	R=0.99
NE%	Y=0.99x+0.46	R=0.93
NE #	Y=0.91+0.31	R=0.98
LI%	Y=1.02x+0.23	R=0.99
LI#	Y=1.03x+0.20	R=0.99
MO%	Y=0.92x+1.22	R=0.84
MO#	Y=1.00x+0.01	R=0.90
EO%	Y=0.96x+0.29	R=0.96
EO#	Y=0.75x-0.00	R=0.86

	PIASTRINE	
PLT<150x10 ³ /μL	Y=1.06x-6.5	R=0.97
PLT<80x10 ³ /μL	Y=0.97x-2.81	R=0.97
PLT<20x10 ³ /μL	Y=0.60x-0.02	R=0.96

Dati preliminari indicano che i PP su LH500 variano come su LH750. Es. LLC: diminuzione Volume M dei LI, displasia mieloide: diminuzione Scatter M dei NE, cellule immature mieloidi: aumento SD e M Volume dei NE.

Discussione e Conclusioni. LH500 dimostra un'ottima sovrapponibilità rispetto a LH750. I conteggi si sono rivelati ben correlati sia per campioni normali che patologici per tutti i parametri. In particolare per le PLT sono stati considerati quattro intervalli di conteggio con correlazioni ottime anche a conte basse. Per quanto riguarda l'analisi dei PP, dati preliminari indicano che il sistema ne rileva variazioni in campioni patologici secondo lo stesso andamento già noto su LH750, saranno necessari ulteriori dati per confermare statisticamente tali evidenze.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ CLINICA DELLE SEGNALAZIONI DI SOSPETTO MORFOLOGICO LEUCOCITARIO DEL SISTEMA EMATOLOGICO COULTER LH500**H-19****Fusco I.*, Rizzuti G.*, Iordache L.*, Malgeri U.**, Durzini O.****

*Laboratorio Analisi Ospedale Misericordia e Dolce, USL 4 PRATO ** Instrumentation Laboratory

Scopo del Lavoro. Valutazione delle flag di sospetto morfologico leucocitario del sistema ematologico Coulter LH500, recentemente introdotto sul mercato.

Materiali e Metodi. LH500 esegue i conteggi cellulari con tecnologia AccuCount, la Formula leucocitaria con Tecnologia VCS, analisi simultanea e multiparametrica dei leucociti allo stato nativo (Volume, Conduttività - grandezza/densità nucleo, rapporto nucleo/citoplasma, Scatter laser - granularità cellulare). L'eventuale presenza di cellule patologiche viene evidenziata mediante specifiche segnalazioni di sospetto e risulta evidente anche dalla rappresentazione grafica sul citogramma VCS, nonché dalla variazione dei 24 Parametri Posizionali (parametri di ricerca). Per la valutazione sono stati analizzati 101 campioni di sangue periferico, prelevato in EDTA, di soggetti normali e patologici della routine del laboratorio. Le letture di riferimento sono state effettuate al microscopio da 2 operatori su 200 cellule secondo le linee guida NCCLS H20 A (Colorazione: May Grunwald-Giemsa). Le cellule patologiche considerate per i conteggi di riferimento sono state:

BLASTI > 0.5% (Segnalazione strumentale: Linfoblasti - Monoblasti - Mieloblasti)

GRANULOCITI IMMaturi - Promielociti - Mielociti - Metamielociti - Bands >1% (Segnalazione strumentale: Gr. Immaturi 1 - Gr. Immaturi 2)

LINFOCITI ATIPICI - Atipici - Attivati - Prolinfociti - >1% (Segnalazione strumentale: LINFO VARIANTI)

ERITROBLASTI >1% (Segnalazione strumentale: NRBC)

Risultati. I dati della valutazione sono stati: per BLASTI Sensibilità (Se.) 71,43%, Specificità (Sp.) 89,36%, Efficienza (Ef.) 88,11%; per GRANULOCITI IMMaturi Se. 82,61%, Sp. 76,92%, Ef. 78,21; per LINFOCITI ATIPICI Se. 87,50%, Sp. 97,85%, Ef. 97,02; per ERITROBLASTI Se. 100%, Sp. 96,88%, Ef. 97,02.

Discussione e Conclusioni. L'efficienza della segnalazione di cellule patologiche nei campioni della routine è un aspetto fondamentale per il laboratorio di analisi. Infatti, gli analizzatori ematologici pur non facendo diagnosi, eseguono un approfondito screening dei campioni, differenziandoli tra "normali", che possono essere validati senza ulteriori approfondimenti, e "patologici", che richiedono ulteriore revisione. Una buona capacità di screening evita il pericolo dei falsi negativi e garantisce che non ci sia un numero troppo elevato di falsi positivi, i quali rallenterebbero inutilmente il flusso di lavoro. Coulter LH500 è risultato pienamente affidabile dimostrando ottime performance nello screening della formula leucocitaria e nelle relative segnalazioni.

POINT OF CARE IN COAGULAZIONE: CONFRONTO TRA IL SISTEMA INRATIO E COAGUCHEK**H-20****Paoletti O., Alatri A., Morstabilini G., Denti N., Martellenghi E., Medagliani MA., Testa S.**

Centro Emostasi e Trombosi, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, A.O. Istituti Ospitalieri di Cremona

I coagulometri portatili sono sistemi che consentono l'esecuzione di test quali PT, aPTT, su sangue capillare. Presso il CET dell'Ospedale di Cremona è attivo un sistema di periferizzazione per la gestione dei pazienti in TAO che prevede la determinazione dell'INR su sangue capillare in pazienti selezionati, mediante l'utilizzo del sistema Coaguchek S (Roche Diagnostics)

Scopo del Lavoro: valutare il sistema INRatio (Dasit) per la determinazione del tempo di Protrombina su sangue capillare in pazienti in TAO, confrontandolo con il sistema in uso nelle sedi periferiche del CET di Cremona ed il sistema utilizzato nel laboratorio centrale, determinando i valori di INR sia con la tromboplastina usuale (Neoplastin Plus Stago), che con una tromboplastina ricombinante (Recombiplastin Ortho Diagnostics)

Materiali e Metodi: -Sistema INRatio (Dasit,). Utilizza una tromboplastina ricombinante umana, prevede l'esecuzione di un controllo di qualità interno.

- Sistema Coaguchek S (Roche Diagnostics,). Utilizza una tromboplastina liofila di coniglio ad ISI=1.84; .

- Analizzatore automatico STA Rack Diagnostica Roche. In uso presso il Laboratorio dell'Ospedale di Cremona, utilizza una tromboplastina di coniglio (Neoplastin) ad ISI =1.31.

Nella stessa seduta analitica i valori di INR sono stati determinati utilizzando anche una tromboplastina ricombinante. I campioni sono stati ottenuti da 80 pazienti in TAO con diversa intensità di coagulazione e da 20 volontari sani non in TAO. Per l'analisi dei dati ed il confronto dei diversi sistemi è stato calcolato il coefficiente di correlazione e le rette di regressione lineare; per la rappresentazione grafica è stata utilizzata la metodica di Bland & Altman.

Risultati: Si sono ottenuti coefficienti di correlazione compresi tra 0.88 e 0.93; la miglior correlazione si è evidenziata tra il sistema Coaguchek e la tromboplastina ricombinante. Nonostante la buona correlazione, il metodo statistico di Bland & Altman ha evidenziato una sovrastima dei valori di INR ottenuti con il sistema INRatio rispetto al sistema Coaguchek e allo STA-R con entrambe le tromboplastine, soprattutto per i valori più elevati di INR. Comunque, nel 95% dei casi i risultati si collocano entro le +/- 2 ds rispetto al riferimento.

Discussione e Conclusioni: I confronti tra i differenti sistemi mostrano un'ottima correlazione dei risultati. L'analisi delle concordanze evidenzia una maggiore differenza dei dati ottenuti con il sistema INRatio confrontato con il sistema di riferimento e con il Coaguchek. Tale differenza è dipendente dal valore di calibrazione delle tromboplastine e dal conseguente calcolo dell'INR. Il sistema INRatio mostra un'ottima maneggevolezza che, unitamente alla sufficiente accuratezza dei dati, lo rendono un buon sistema per la determinazione rapida del PT su sangue capillare. Sarebbe auspicabile che tutte le aziende rendessero noto il valore di ISI delle tromboplastine utilizzate nei sistemi portatili e il tipo di calibrazione, e che garantissero un sistema di controllo di qualità. Si consiglia, prima di utilizzare un coagulometro portatile, calcolare, nelle singole realtà, l'entità delle differenze rispetto al sistema di riferimento.