

I dosaggi immunologici per l'endocrinologia: evoluzione delle indicazioni cliniche e tecnologiche

S.Meneghelli, F.Poltronieri, I.Battilotti, M.Filippini, M.Marin, B.Caruso

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Verona

Scopo del lavoro

Valutare nella esperienza di un laboratorio di medie grandi dimensioni l'impatto dell'evoluzione tecnologica sui dosaggi immunometrici rivolti alle patologie endocrinologiche avvenuta nel periodo 1993-2000, sulla base anche di raffronti tra le variazioni di costo dei reagenti.

Materiali e Metodi

I dati riguardanti gli esami eseguiti sono stati ricavati dal programma di statistica del L.I.S. del laboratorio ed elaborati su Microsoft Excel. La selezione delle richieste è avvenuta sulla base della tipologia di esame e differenziando inoltre le richieste di pazienti ricoverati da quelle di provenienza ambulatoriale o da ospedali esterni. Il raggruppamento sintetico degli analiti è stato eseguito in base alla patologia funzionale d'organo o di sistema.

Risultati

1. L'analisi degli esami eseguiti presso il settore Ormoni nel periodo 1993-2000 evidenzia:
 - 1.1 calo di richieste negli anni 1996-97 e una successiva ripresa; 1.2 Innalzamento di circa il 10% di richieste esterne nell'anno 2000 in concomitanza all'istituzione di attività ambulatoriali specialistiche (AMID)L'analisi dei dati sui singoli analiti si è limitata ai due pannelli diagnostici più indicativi per le patologie endocrinologiche: tiroideo e osseo.
2. Per quanto riguarda la patologia tiroidea si è rilevato:
 - 2.1 Incremento del numero di richieste per tale diagnostica in seguito alla riduzione dei tempi di risposta dopo l'introduzione di sistemi automatici di dosaggio; 2.2 La sospensione del dosaggio di T3 e T4 ha portato un aumento di richieste per le frazioni "libere"; 2.3 Si assiste ad un calo di richieste per AbTG, nelle recenti indicazioni diagnostiche, infatti, questo dosaggio non rientra tra gli esami di screening per sospetta tiroidite, ma è indicato come indice a specifico dello stato infiammatorio della tiroide.
3. Una attenta valutazione del pannello osseo dimostra:
 - 3.1 L'incremento delle richieste di dosaggio di PTH, che rappresenta l'analita predominante dell'intero pannello, in seguito ad automazione della metodica di dosaggio; 3.2 Il confronto tra la percentuale di richieste dei due sottogruppi: funzionalità ossea (PTH, osteocalcina, e UDPD) e accrescimento (GH e somatomedina C) pone in evidenza l'incremento del primo gruppo rispetto il secondo; 3.3 Lo studio statistico percentuale dei parametri di accrescimento, sul totale degli esami del pannello osseo, evidenzia che il calo di richieste per il GH è stato accompagnato dall'aumento delle richieste di somatomedina C, esame compreso nel primo livello diagnostico per le patologie legate alla crescita.
4. Nell'ambito dei due pannelli diagnostici si sono poi valutate le variazioni del costo/reagente per analita in relazione agli aggiornamenti tecnologici avvenuti nel periodo considerato:
 - 4.1. Si è dimostrato un calo del costo-reagente solo per il TSH; 4.2 L'incremento delle richieste per PTH e somatomedina C, unitamente all'adozione di un metodo automatizzato per il dosaggio del PTH, ha permesso l'esecuzione in tempi più brevi, limitando lo spreco per decadenza dei reagenti e portare il rapporto costo-reagente/produttività a livelli più accettabili;

Discussione e conclusioni

L'utilità di semplici elaborazioni statistiche è quella di fornire un parametro concreto di valutazione della evoluzione del laboratorio clinico sia in termini diagnostici sia di costi. Potrà essere valutato in futuro con questo tipo di indagine l'effettivo risparmio e la maggiore efficienza clinica del laboratorio dopo l'introduzione della tecnologia del "reflexing test".

IL LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA NELL' IPOTIROIDISMO : UNO STUDIO DI INCIDENZA IN TRE CENTRI OSPEDALIERI IN PROVINCIA DI BRINDISI

Dr. Laneve M.^a, Dr. Balsamo A.^b, Dr. Tundo D.^a, Dr. Vinci E.^a

^a Dipartimento di Medicina di Laboratorio AUSL BR/1; ^b Laboratorio di Patologia Clinica Azienda Ospedaliera "A.Di Summa" Brindisi

Scopo del lavoro

Nel nostro lavoro ci siamo proposti di evidenziare l' importanza del dosaggio combinato di TSH ed FT4 nella diagnosi e monitoraggio dell' ipotiroidismo (ipot.). L' ipot. è caratterizzato da una ridotta attività ormonale tiroidea. Schematicamente distinguiamo: a) Ipot. primitivo (causato da una riduzione del tessuto tiroideo funzionante, congenita o acquisita, oppure da una alterata biosintesi degli ormoni tiroidei); b) Ipot. secondario (causato da ridotta stimolazione ipotalamo-ipofisaria o da resistenza periferica congenita agli ormoni tiroidei). E' noto che il TSH indica il livello di stimolazione ipofisaria e che il suo rilascio è controllato mediante feedback negativo dall' FT4 ed FT3; il dosaggio dell' FT4 è più affidabile di quello del T4 perchè l'FT4 è l'unica che penetra nei tessuti periferici ed il suo titolo non è influenzato da reazioni spontanee o indotte da farmaci. Il nostro studio è stato effettuato, nell'arco di tempo compreso tra Giugno 2000 e Maggio 2001, presso il Laboratorio (Lab.) di Patologia Clinica dell' Azienda Ospedaliera "Di Summa" di Brindisi (1), il Lab. del Presidio Ospedaliero di Ceglie M. -BR- (2) ed il Lab. del Presidio Ospedaliero di Fasano -BR- (3).

Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta su pazienti (pz.) pervenuti ai nostri laboratori come ricoverati o ambulatoriali esterni, utilizzando i seguenti analizzatori automatici : ACS 180 plus (Bayer) e IMMULITE 2000 (Medical Systems), che sfruttano metodiche immunoenzimatiche. Le unità di misura ed i range di riferimento adottati per le determinazioni analitiche sono stati : a) TSH = 0.3 - 4 MUI/ML; b) FT4 = 8 - 18 PG/ML.

Risultati

Complessivamente abbiamo esaminato 9692 pz. di cui 4671 presso il Lab. 1, 1630 presso il Lab. 2 e 3391 presso il Lab. 3, ed abbiamo rilevato i dati riportati nella seguente tabella :

| Laboratorio di Patologia Clinica | Numero dei Pazienti | Numero di TSH al di sopra del range | Numero di FT4 al di sotto del range |
|----------------------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Lab. 1 | 4671 | 690 | 187 |
| Lab. 2 | 1630 | 130 | 30 |
| Lab. 3 | 3391 | 249 | 54 |

Discussione e Conclusioni

Dai dati raccolti abbiamo riscontrato che, come segnalato in letteratura, solo una percentuale di soggetti con valore di TSH al di sopra del range presentano valori di FT4 nettamente al di sotto del range. Comunque si sottolinea l'utilità clinica e diagnostica del dosaggio simultaneo di TSH ed FT4 nelle patologie ipertiroidiche.

LIVELLI DI OMOCISTEINEMIA NELL'IPOTIROIDISMO PRIMARIO SUBCLINICO PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON L-T4

P.De Remigis, F.M.Lattanzio *, S.Martinotti *, L.Talone *, N.Chiavaroli, L.Vianale

Centro Regionale Malattie della Tiroide e di Endocrinologia O.C.Chieti e * Pat. Clinica II Università di Chieti

Scopo del lavoro

L'ipotiroidismo primario subclinico rappresenta una condizione molto diffusa; tuttavia il trattamento sostitutivo con levotiroxina è controverso, in quanto essendo per definizione una forma laboratoristica (TSH di poco elevato, mentre gli ormoni tiroidei sono nella norma e priva di segni clinici), i vantaggi di una tale terapia sono inapprezzabili. A favore del trattamento giocherebbe un miglioramento di alcuni parametri metabolici e cardiaci.

E' stato recentemente osservato che nell'ipotiroidismo conclamato i livelli sierici di omocisteina sono elevati, ma non è stato determinato se anche in una condizione subclinica ciò avvenga.

Infatti l'omocisteina rappresenta un fattore di rischio cardiovascolare e un suo incremento in tale condizione potrebbe costituire un ulteriore argomento a favore del trattamento con levotiroxina.

Materiali e metodi

A questo scopo abbiamo studiato 75 soggetti di sesso femminile affetti da ipotiroidismo primario subclinico (TSH con livelli tra 5-10 e FT4 nella norma), con età media di 48,8: sono stati sottoposti a trattamento con levotiroxina con un dosaggio adeguato al ripristino della normalità del TSH, avvenuto in un arco di tempo di 2 mesi.

Prima e dopo è stato eseguito un prelievo di sangue al mattino per dosare oltre il TSH e FT4, anche i livelli sierici di omocisteina (sHT).

Il TSH e FT4 sono stati dosati con metodo immunometrico, l'omocisteina con metodo immunologica a fluorescenza con luce polarizzata.

L'analisi statistica è stata eseguita con il t di Student

Risultati

| | | |
|-------------|----------------|-----------------|
| età | 48.8 | |
| TSH | 8.43 ± 3.1 | 2.63 ± 1.69 |
| FT4 | 8.95 ± 2.75 | 12.02 ± 2.39 |
| Omocisteina | 8.14 ± 3.17 | 6.61 ± 2.11 |



Discussione e Conclusioni

E' stato rilevato che anche modesti aumenti dei livelli di omocisteina possono associarsi ad un aumentato rischio cardiovascolare. Nell'ipotiroidismo conclamato è stato dimostrato un aumento di omocisteina come possibile fattore di aterogenesi.

I nostri risultati dimostrano che, in soggetti affetti da ipotiroidismo primario latente, i livelli di omocisteinemia sono significativamente aumentati rispetto agli stessi soggetti una volta riportati all'eucrinia tiroidea dopo trattamento sostitutivo con levo-tiroxina.

In conclusione tale dimostrazione potrebbe rappresentare un ulteriore e importante argomento a favore del trattamento di una condizione, quale l'ipotiroidismo subclinico, in ragione della riduzione di un parametro che si configura come un importante fattore di rischio cardiovascolare.

MALATTIA DI HASHIMOTO, L-TIROXINA ED OMOCISTEINA

A. Gianotti °, U. Filippi °°

° Servizio di Patologia Clinica, Ospedale S. Carlo, Genova;

°° Divisione di Medicina Generale, Ospedale S. Carlo, Genova

Scopo del lavoro

Alcuni autori recentemente hanno segnalato in pazienti ipotiroidei livelli aumentati di omocisteina che, dopo congrua terapia con l-tiroxina, sarebbero tornati alla normalità. Ci siamo proposti di verificare quanto riportato.

Metodi e Risultati

Abbiamo studiato, a questo proposito, 12 pazienti ipotiroidei (TSH > 4 microIU/mL), 11 con malattia di Hashimoto, mentre in uno la carenza ormonale era dovuta all'ablazione chirurgica della ghiandola per gozzo multinodulare. L'omocisteina plasmatica (Immulite 2000) è risultata 9.5 +/- 2.1 micromol/L (media +/- DS). Nessuno, essendo dati basali, aveva assunto terapia col l-tiroxina od omologhi. Addirittura i due pazienti con i livelli di TSH maggiori (53.4 e 103.9 microIU/mL) hanno mostrato i livelli di omocisteina tra i più bassi dello studio (7.4 e 7.9 micromol/L rispettivamente). Tutti presentavano valori normali di vit. B6, B12 e acido folico. A distanza di 6 mesi (e quindi dopo terapia ormonale), ad un nuovo controllo, l'omocisteina media era 9.1 +/- 2.5 micromol/L.

Conclusioni

Pertanto, anche se la casistica è esigua, non abbiamo rilevato alcuna correlazione tra ipotiroidismo e iperomocisteinemia e neppure una riduzione significativa al vaglio statistico dell'omocisteina dopo terapia con l-tiroxina.

Bibliografia essenziale:

Atherosclerosis 2001 Mar;155(1):195-200

Ann Intern Med. 2000 Apr 18;132(8):677.

GLI STRUMENTI NELLA EVIDENCE BASED MEDICINE (EBLM) PER I LIMITI DI RIFERIMENTO PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-PEROSSIDASI TIROIDEA

R.M.Dorizzi, F.Poltronieri, I.Battilotti

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera di Verona, Verona

Scopo del Lavoro

La patologia descritta da Hashimoto nel 1912 ha cominciato ad essere investigata dal laboratorio mezzo secolo dopo prima con la dimostrazione degli anticorpi anti-tireoglobulina e poi con quella degli anticorpi anti-perossidasi tiroidea (AbTPO). L'impiego di questi metodi è stato ostacolato dal succedersi di tecnologie diverse per questo tipo di analisi e dalla scarsa comparabilità dei metodi immunologici. La produzione di intervalli di riferimento è stato ostacolata dalla presenza relativamente frequente di AbTPO anche in soggetti clinicamente negativi. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di calcolare i valori di cut-off ottimali impiegando gli strumenti raccomandati dalla EBLM per un nuovo metodo per la determinazione degli AbTPO.

Materiali e Metodi

Nel nostro laboratorio è stata misurata la concentrazione di AbTPO in 173 soggetti sospettati di disfunzione tiroidea; 133 sono stati classificati eutiroidei sulla base dei dati di laboratorio e dell'esame clinico e 40 ipotiroidei. Le determinazioni sono state eseguite con un analizzatore automatico (Advia Centaur, Bayer) ed un metodo in chemiluminescenza che impiega due anticorpi monoclonali (MAX1 e MORITZ2).

Risultati

In tabella sono mostrati Sensibilità, Specificità, Quoziente di probabilità positivo e negativo, Predittività di un risultato positivo e negativo a diversi valori di cut-off e di prevalenza.

| Prev | Cut-off | Sens | In.Con. | Spec | In.Con. | LR+ | LR- | PVP | PVN | Effic |
|------|---------|------|---------|------|---------|------|------|------|-----|-------|
| 0.1 | 60 | 82 | 69-91 | 93 | 87-96 | 10.9 | 5.15 | 55 | 98 | 91 |
| 0.1 | 100 | 82 | 69-91 | 94 | 89-96 | 13.6 | 5.24 | 60 | 98 | 93 |
| 0.1 | 200 | 77 | 63-87 | 95 | 90-97 | 14.6 | 4.1 | 77 | 95 | 93 |
| 0.1 | 300 | 77 | 63-87 | 98 | 94-99 | 34.1 | 4.23 | 79 | 97 | 96 |
| 0.1 | 680 | 72 | 57-83 | 99 | 96-100 | 95.5 | 3.52 | 91 | 97 | 96 |
| 0.3 | 60 | 82 | 69-91 | 93 | 87-96 | 10.9 | 5.15 | 82 | 92 | 89 |
| 0.3 | 100 | 82 | 69-91 | 94 | 89-97 | 14.6 | 4.1 | 85 | 92 | 90 |
| 0.3 | 200 | 77 | 63-87 | 95 | 90-97 | 13.6 | 5.24 | 86 | 95 | 89 |
| 0.3 | 300 | 76 | 63-87 | 97 | 94-99 | 34.1 | 4.23 | 94 | 91 | 91 |
| 0.3 | 382 | 77 | 63-87 | 98 | 95-100 | 51.1 | 4.27 | 95.6 | 91 | 92 |
| 0.5 | 60 | 82 | 69-91 | 93 | 87-96 | 10.9 | 5.15 | 92 | 84 | 87 |
| 0.5 | 100 | 82 | 69-91 | 94 | 89-97 | 13.6 | 5.24 | 93 | 84 | 88 |
| 0.5 | 200 | 77 | 63-87 | 95 | 90-97 | 14.6 | 4.1 | 94 | 80 | 85 |
| 0.5 | 300 | 77 | 63-87 | 97 | 94-99 | 34.1 | 4.23 | 97 | 81 | 87 |
| 0.5 | 53 | 84 | 72-93 | 92 | 88-95 | 11.2 | 6.01 | 92 | 86 | 89 |
| 0.7 | 60 | 82 | 69-91 | 93 | 87-96 | 10.9 | 5.15 | 97 | 68 | 85 |
| 0.7 | 100 | 82 | 69-91 | 94 | 89-97 | 13.6 | 5.24 | 97 | 69 | 86 |
| 0.7 | 200 | 77 | 63-87 | 95 | 90-97 | 14.6 | 4.1 | 94 | 80 | 85 |
| 0.7 | 300 | 77 | 63-87 | 97 | 94-99 | 34.1 | 4.23 | 97 | 81 | 87 |
| 0.7 | 21 | 84 | 72-93 | 87 | 81-91 | 6.6 | 5.7 | 94 | 71 | 86 |

Discussione e conclusioni: Il valore di cut-off di 100 KU/L consente prestazioni migliori rispetto a quello proposto dal produttore (60 KU/L) mentre non vi sono miglioramenti sostanziali tra le prestazioni dei cut-off 100 e 200 KU/L.

Ruolo di Sgk (Serum and glucocorticoid regulated kinase) nella trasduzione del segnale antiapoptotico dell'insulina.

M. Corea, P. Ripa, R. Amato, N. Perrotti

Dipartimento di Medicina Sperimentale Clinica. Università Magna Graecia di Catanzaro.

Scopo del lavoro

Iperensione, obesità con iperinsulinemia, diabete mellito con insulino-resistenza, sono spesso associati come fattori di rischio dell'aterosclerosi, anche se i meccanismi patogenetici di questo legame sono ad ora sconosciuti. Un effetto sodio ritentivo dell'insulina è stato descritto da tempo. Sgk (Serum and glucocorticoid regulated kinase) costituisce un interessante candidato per chiarire la patogenesi dell'ipertensione associata ad iperinsulinemia ed insulino-resistenza. Il riassorbimento del sodio, da parte delle cellule principali del rene è, in buona parte, dovuto all'attività del canale del sodio epiteliale, sensibile all'amiloride (E.Na.C.). L'attività di questo canale è regolata da una kinasi, SGK (serum and glucocorticoid regulated kinase), il cui gene è attivato, al livello trascrizionale dall'aldosterone e dal siero. L'insulina, attraverso una via di trasduzione del segnale che coinvolge i recettori di membrana, i loro substrati, l'enzima fosfatidil inositolo 3 kinasi (PI3 kinasi), e le Kinasi dipendenti da fosfoinositidi (PDK1 e PDK2) sono in grado di regolare, al livello postraduzionale, l'attività di SGK. Tale regolazione si realizza attraverso la fosforilazione di due aminoacidi, la treonina 256 e la serina 422, che sono contenuti in sequenze di consenso caratteristiche dei substrati di PDK1 e PDK2, rispettivamente. L'attività enzimatica è, inoltre, suscettibile di attivazione da parte di analoghi di cAMP, attraverso la fosforilazione, dipendente da PKA, della treonina 369. Questo suggerisce che vasopressina ed altri ormoni che agiscono attivando la sintesi di cAMP, possano avere un ruolo nella regolazione del canale del sodio amiloride sensibile. Il trasporto del sodio, in cellule A6 stabilmente trasfettate con Sgk wild type, è molto aumentato. L'iperespressione di Sgk, indotta in adipociti di ratto da vettori adenovirali, stimola il trasporto del glucosio, suggerendo per Sgk un ruolo analogo a PKB.

PKB è anche coinvolta nella trasduzione del segnale antiapoptotico dell'insulina. Con il presente lavoro ci siamo proposti di verificare il possibile ruolo di Sgk nella regolazione dell'apoptosi indotta da stress iperosmotico in cellule endoteliali.

Materiali e metodi

Il ruolo di sgk nel mediare gli effetti antiapoptotici dell'insulina è stato studiato in cellule endoteliali stabilmente trasfettate con vettori eucariotici esprimenti Sgk wild type e mutante. Il mutante D222A, inattivo come chinasi, si era dimostrato un buon dominante negativo in sistemi cellulari utilizzati per la valutazione del trasporto del sodio. Lo stress osmotico è stato indotto aumentando di 100 mM la concentrazione di sodio cloruro del mezzo di coltura. L'apoptosi è stata studiata mediante colorazione con annessina e ioduro di propidio. La attivazione di segnali antiapoptotici è stata verificata analizzando il livello di fosforilazione della serina 136 di Bad.

Risultati

Cellule endoteliali stabilmente trasfettate con Sgk wild type sono protette dall'apoptosi indotta da stress iperosmotico. Le cellule trasfettate con il mutante D222A sono particolarmente suscettibili all'apoptosi, sia in condizioni basali, che dopo stimolo con sodio cloruro. Le stesse cellule, inoltre, presentano un livello di fosforilazione di Bad grandemente ridotto, suggerendo che il mutante D222A si comporta come dominante negativo nei confronti della fosforilazione di Bad indotta da PKB o da Sgk endogeni.

Discussione e Conclusioni

Il gene Sgk sembra essere dunque al crocevia di importanti vie metaboliche, potenzialmente coinvolte nella patogenesi della ritenzione sodica associata all'iperinsulinemia ed all'insulino resistenza. I nostri dati dimostrano, inoltre, un ruolo di Sgk nella trasduzione di segnali antiapoptotici in cellule endoteliali.

La ciclosporina nel paziente sottoposto a trapianto di cellule staminali allogeniche portatore di CVC

Luchetti B., Severini L., Lucchetti A., Innocenti B., *Albiani A., *Martinelli L., Rossi L.

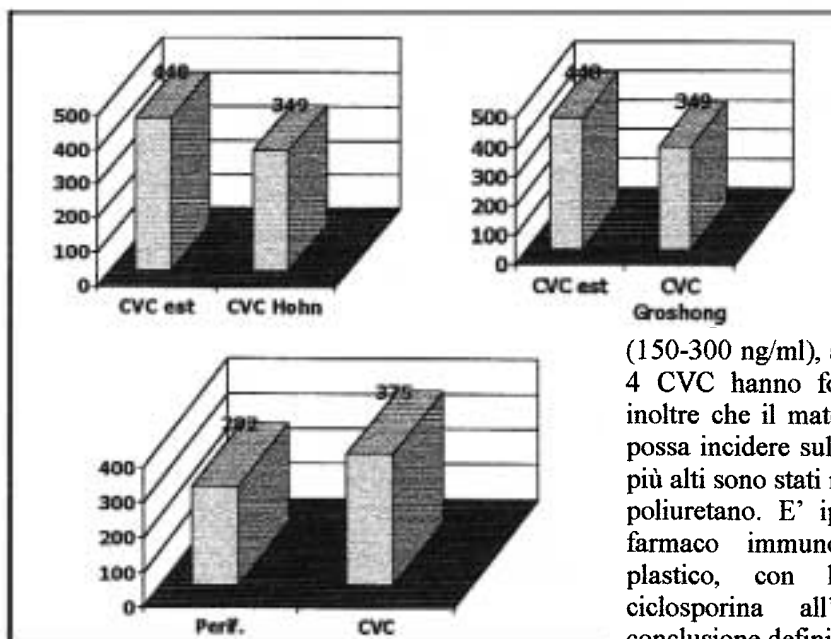
Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, *U.O. Ematologia-Trapianti Midollo Osseo
Azienda Ospedaliera Pisana

Scopo del lavoro-La ciclosporina (CSA) è una molecola ad attività immunosoppressiva in grado di diffondere passivamente attraverso la membrana cellulare e legarsi ad un recettore citosolico delle cellule linfocitarie denominato ciclofillina, appartenente alla famiglia delle peptidil-profil cis-trans isomerasi, coinvolte nei processi di folding delle proteine. E' stato dimostrato che il complesso ciclofillina-ciclosporina, attraverso un particolare meccanismo, inibisce la sintesi dell'interleuchina 2, evento che rappresenta l'azione biologica della farmaco. Lo studio, preliminare e attualmente in corso, si propone di valutare il dosaggio della ciclosporina in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di midollo, portatori di CVC (catetere venoso centrale), utilizzando campioni prelevati da sangue periferico, dallo stesso CVC e da CVC di tipo diverso.

Materiali e metodi

Sono stati valutati i dosaggi effettuati su quattro pazienti portatori di CVC di tipo diverso (Groshong⁽¹⁾, Hohn⁽²⁾, esterno a 2⁽³⁾ o 3⁽⁴⁾ vie); ogni paziente ha eseguito una serie di determinazioni seriali della ciclosporina su sangue periferico e da CVC. Questi cateteri, utilizzati prevalentemente per la somministrazione della terapia, hanno caratteristiche diverse, come il materiale di composizione (silicone^(1 e 2) o poliuretano^(3 e 4)) o la permanenza in situ (periodi variabili tra 1 e 6 mesi). Quelli in silicone, preferibilmente tunnellizzati⁽¹⁾, sono di solito ben tollerati dall'organismo e, anche grazie al tipo di innesto utilizzato, ottimali per una permanenza extraospedaliera. Il dosaggio della ciclosporina, su campioni di plasma con anticoagulante EDTA, è stato eseguito utilizzando la tecnologia FPIA (fluorescenza a luce polarizzata) su analizzatore AxSYM (Abbott), preceduto da opportuno trattamento del campione.

Risultati- (media delle determinazioni): periferico/CVC (serie completa), tra CVC.



Discussione e conclusioni

La possibilità di utilizzare il CVC come punto di prelievo per il controllo della terapia rappresenta per il medico un'ottima alternativa alla ricerca di una periferica in un paziente clinicamente difficile; il prelievo da vena periferica, rispetto al CVC, fornisce valori di CSA più vicini al range terapeutico (150-300 ng/ml), al contrario i risultati ottenuti dai 4 CVC hanno fornito dati più elevati. Sembra inoltre che il materiale di fabbricazione del CVC possa incidere sul risultato: dosaggi sensibilmente più alti sono stati riscontrati nei prelievi da CVC in poliuretano. E' ipotizzabile un'interazione tra il farmaco immunosoppressore ed il materiale plastico, con la possibile permanenza di ciclosporina all'interno del catetere? Alla conclusione definitiva dello studio questa risposta.

MISURA DELLA CICLOSPORINA SENZA PRETRATTAMENTO SU ANALIZZATORE DI CHIMICA CLINICA DIMENSION RxL. VALUTAZIONE DEL METODO.

G. Dall'Olio, M. Pizzolato, M. Spellanzon, G. Soffiati
Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "S.Bortolo", Vicenza

INTRODUZIONE

Scopo del lavoro è la valutazione delle caratteristiche chimico analitiche di un kit per la determinazione della ciclosporina (CYA) su sangue intero predisposto per l'utilizzo sull'analizzatore di chimica clinica Dimension RxL (DADE-Behring) con il modulo eterogeneo.

MATERIALI E METODI

Il metodo automatizzato impiega una tecnica immunologica in cui la specie anticorpo-enzima della CYA libera e legata sono separate mediante particelle magnetiche. I reagenti sono contenuti in una cartuccia Flex^R per il metodo specifico. Per eseguire il test devono essere posti in cuvette 200 µL di sangue intero.

Calibratori (ng/mL): 0, 80, 180, 330, 500. Reagenti e calibratori sono forniti dalla ditta DADE-Behring.

I controlli a due livelli di concentrazione sono della ditta Bio-Rad. Sono state effettuate prove di precisione nella serie sui due controlli, fra le serie analizzando in doppio per cinque giorni lavorativi i due controlli; diluizione effettuando 7 diluizioni seriali da un campione ad elevata concentrazione; correlazione con il sistema in uso Elan Eppendorf (EMIT 2000 con pretrattamento del campione).

RISULTATI

Precisione: - nella serie: livello 1: n=10 media=64.0 ng/mL; sd=3.7; CV%=5.9

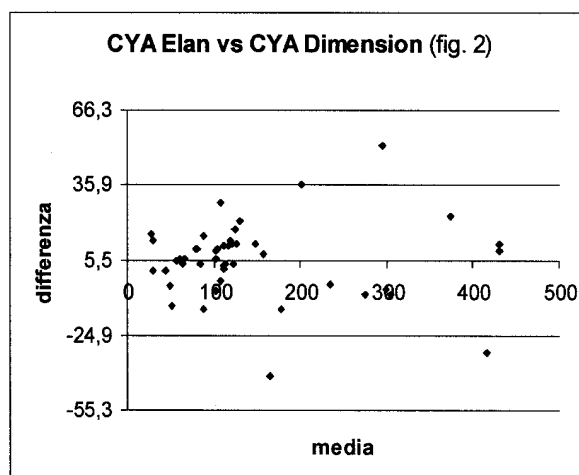
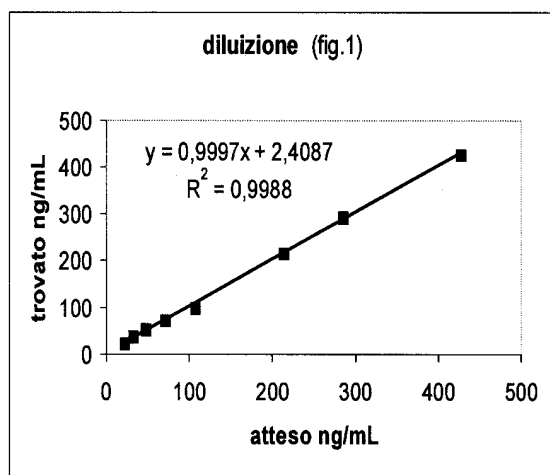
livello 2: n=10 media=216.8 ng/mL; sd=5.4; CV%=2.5

- fra le serie: livello 1: n=10 media=59.4 ng/mL; sd=3.7; CV%=9.3

livello 2: n=10 media=215.7 ng/mL; sd=10.3; CV%=4.8

Diluizione (fig.1): n=8; $y = 0.99x + 2.40$; $R^2 = 0.99$; recupero medio=105.5% (92.4% - 115.4%); range (ng/mL) : 426 - 23

Correlazione (fig.2): n=50; $y = 0.99x - 4.65$; $R^2 = 0.98$; $S_{yx} = 15.37$



CONCLUSIONI

Le caratteristiche chimico analitiche di precisione ed accuratezza del metodo in esame e l'analisi comparativa con quello in uso portano a concludere che il nuovo metodo risponde alle esigenze cliniche del monitoraggio della terapia con ciclosporina. I reattivi pronti all'uso in cartuccia Flex^R e la sola necessità di predisporre nelle coppette il sangue intero senza pretrattamento, riducono notevolmente i tempi di esecuzione e limitano gli errori legati alla manipolazione del campione.

MONITORAGGIO DEI LIVELLI SIERICI DI IMMUNOGLOBULINE E CITOCHINE IN PAZIENTI IN TRATTAMENTO CRONICO CON FARMACI ANTIEPILETTICI.

Dominijanni A., De Sarro GB., Berlinghieri MC., *Elia M., *Musumeci SA., Ferreri G., Gulletta E.

Cattedra di Patologia Clinica e Farmacologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica "G. Salvatore", Università degli Studi "Magna Graecia" Catanzaro.

*Ass. "Oasi Maria Santissima", Istituto di Ricerca e Cura, Troina, Enna.

Scopo del lavoro

Numerosi studi indicano che i farmaci antiepilettici possono modificare l'attività dei canali ionici delle cellule neuronali. Un simile effetto è osservabile anche nelle cellule immunocompetenti in seguito ad una trasduzione del segnale dovuta a cause sia fisiologiche che patologiche. (Pacifci et al., 1991; 1999).

Scopo del nostro studio è quello di osservare l'effetto del trattamento cronico con antiepilettici su alcuni parametri immunologici quali: immunoglobuline (Igs), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interferone- γ (IFN- γ) e il recettore solubile dell'interleukin-2 (IL-2Rs).

Materiali e metodi

Sono stati studiati 85 pazienti (40 uomini e 45 donne) in trattamento cronico con carbamazepina (CBZ), fenitoina (PHT), fenobarbital (PB) e valproato (VPA) per un periodo di 60 mesi. In alcuni di questi pazienti alla terapia convenzionale è stata aggiunta la lamotrigina (LMT). Il gruppo di controllo era composto da 20 soggetti (10 uomini e 10 donne) di età compresa tra 15 e 38 anni. Inizialmente abbiamo misurato gli effetti immunologici della fenitoina, della carbamazepina, del fenobarbital e del valproato. In una seconda fase abbiamo valutato se l'aggiunta della lamotrigina alla terapia convenzionale poteva modificare i livelli sierici di immunoglobuline come quelli delle citochine.

51 erano i pazienti in monoterapia (18 CBZ, 8 PHT, 10 PB e 15 VPA) e 34 erano quelli in politerapia. Abbiamo dosato, con una metodica di dosaggio immunoenzimatico (Genzyme, Cambridge U.K.), i livelli sierici di Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interferone- γ (IFN- γ) e del recettore solubile dell'interleukin-2 (IL-2Rs). I valori normali di riferimento di TNF- α , IFN- γ e IL-2Rs sono rispettivamente 10 pg/ml, 3 pg/ml e <100 pg/ml. I livelli sierici di Immunoglobuline, sono stati dosati utilizzando un nefelometro (BNA Plus, Bhering) e i valori sono stati espressi in mg/dl. I livelli sierici dei farmaci antiepilettici sono stati valutati utilizzando una metodica di dosaggio immunoenzimatico (TDX, Abbott). Nello studio sono stati presi in considerazione solo i pazienti i cui livelli sierici erano all'interno del range terapeutico.

Risultati

Nell'8% dei pazienti abbiamo riscontrato livelli sierici di IgA più bassi del normale, in particolare 7 dei 18 pazienti in trattamento con carbamazepina mostravano un decremento nei livelli sierici di IgA. I livelli sierici di IgM ed IgG sono stati ritrovati più bassi del normale nel 6% dei pazienti, questi pazienti rientravano nel gruppo dei 34 pazienti in politerapia. Per quanto riguarda il TNF- α , presentava un significativo aumento dei livelli sierici nel 4% dei pazienti esaminati e inoltre il 23% presentava un aumento del recettore solubile dell'interleukina-2, in particolare, 6 dei 18 pazienti in trattamento con CBZ mostravano un aumento significativo del recettore solubile dell'interleukina-2.

Conclusioni

I cambiamenti dei livelli sierici di IgA ed IL-2Rs sono più frequenti nei pazienti trattati con CBZ. L'aggiunta di lamotrigina non ha modificato i parametri immunologici valutati.

Referenze

Pacifci R, Paris L., Di Carlo S., Pichini S., Ziccaro P. Immunologic aspects of carbamazepine treatment in epileptic patients. *Epilepsia* 1991; 32 (1): 122-127.

Pacifci R, Paris L., Di Carlo S., Bacosi A., Pichini S., Ziccaro. Cytokine production in blood mononuclear cells from epileptic patients. *Epilepsia* 1995; 36 (4): 384-387.

MARCATORI BIOCHIMICI DI ALCOOLISMO

Di Fabio A.M., Di Michele G., Frascaria P., Scimia G., Varrassi M.

Dipartimento di Patologia Clinica - U.O. Medicina di Laboratorio - P.O. "S. Salvatore" - ASL 04 L'Aquila

La ricerca di un marker di laboratorio che consenta di diagnosticare uno stato di alcoolismo è da tempo oggetto di studio e la maggior parte delle informazioni si basano tutt'ora sull'esame dell'alcoolemia. Altri parametri di contorno (GGT, MCV) possono completare un quadro diagnostico che permane ancor oggi clinico, ma non rappresentano affatto marcatori patognomici dell'abitudine alcoolica. Gli incrementi del tasso alcoolemico, limitano del resto al breve periodo la possibilità di sospettare l'assunzione di alcool nelle ore precedenti e comunque non discrimina l'assuntore abituale da quello occasionale. Le conoscenze sulla capacità dell'alcool di alterare biochimicamente la transferrina, suggerisce che il dosaggio della proteina alterata (% CDT transferrina carboidrato-carente), ne possa consentire l'impiego quale marcatore biochimico di assunzione cronica di alcool anche perché questa proteina resta "desialata" a lungo (15-30 gg.) negli assuntori di dosi elevate e abituali di alcool. Restano da chiarire i reciproci rapporti di grandezza tra quantità assunte ed entità della desialazione, anche e specialmente quando si intenda utilizzare il parametro in Medicina Legale (guida di autoveicoli, porto d'armi...) specialmente in una popolazione, quale quella italiana, in cui l'assunzione d'alcool rappresenta un costume ed una cultura ancora abbondantemente diffusa tra la popolazione generale. A ciò si aggiunga che non esiste ancora unanime accordo circa il "normale" consumo pro-capite di alcool e, soprattutto, circa i vari cut-off impiegabili per dirimere l'assuntore, anche abituale ma "non patologico", da quello in cui si sia instaurata una vera e propria tossicomania. Allo scopo di osservare il comportamento del marker %CDT, dosato con il metodo Axis-Shield nella popolazione afferente, per motivi diversi, alla nostra struttura, abbiamo studiato 184 pazienti di età compresa tra 18 e 58 anni suddivisi nei seguenti tre gruppi:

| | | M | F | TOT |
|----------|---|----|----|-----|
| Gruppo A | Pazienti con richiesta di screening (Patente, porto d'armi) | 98 | 10 | 108 |
| Gruppo B | Pazienti con richiesta di follow-up (afferenti dal centro alcoolisti) | 13 | 13 | 26 |
| Gruppo C | Pazienti di controllo (meno di 1 bicch. Di vino al giorno) | 25 | 25 | 50 |

La suddivisione per classi di pazienti nei tre gruppi di studio, mostra la seguente distribuzione di valori:

| Valori di %CDT | Gruppo A | | | Gruppo B | | | Gruppo C | | |
|--------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | M | F | TOT | M | F | TOT | M | F | TOT |
| < 1.20 | - | - | - | - | - | - | 3 | 5 | 8 |
| > 1.20 < 2.60 | 1 | 3 | 4 | - | - | - | 12 | 14 | 26 |
| > 2.60 < 3.90 | 15 | 3 | 18 | - | - | - | 9 | 5 | 14 |
| > 3.90 < 5.20 | 41 | 2 | 43 | - | - | - | 1 | 1 | 2 |
| > 5.20 < 6.50 | 29 | 1 | 30 | 2 | 1 | 3 | - | - | - |
| > 6.50 < 7.80 | 12 | 1 | 13 | - | 2 | 2 | - | - | - |
| > 7.80 < 9.10 | - | - | - | 3 | 5 | 8 | - | - | - |
| > 9.10 (max 16.90) | - | - | - | 8 | 5 | 13 | - | - | - |
| TOTALI | 98 | 10 | 108 | 13 | 13 | 26 | 25 | 25 | 50 |

Il sistema CDT può offrire utili informazioni nel discernere soggetti che assumono piccolissime quantità di alcool (%CDT < 2.60) da quelli che ne fanno un maggior uso. Tra questi, i pazienti alcoolisti cronici presentano costantemente elevati livelli di %CDT (>6.50). L'uso "fisiologico" di alcool determina livelli di % CDT "sostenuti" (>2.60 < 6.50), non sempre in grado di operare il desiderato discernimento.

CONTROLLO TOSSICOLOGICO SU SOGGETTI SOTTOPOSTI A RESTRIZIONE RESIDENZIALE (CARCERE PENALE): ESPERIENZA TRIENNALE DELL'APPLICAZIONE DI UNA PROCEDURA PER LA RACCOLTA E IL TRASPORTO DEI CAMPIONI DI URINA.

L. Marchioro*, F. Bassetto*, A. Codolo*, P. Rizzotti°.

*Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Geriatrico – Azienda ULSS 16 Padova

° Dirigenza Medica – Azienda Ospedaliera di Verona

SCOPO DEL LAVORO

La corretta valutazione dei risultati prodotti, a seguito di una richiesta di esame tossicologico (dosaggio di OPIACEI, METADONE, AMFETAMINE, CANNABINOIDI, COCAINA ed occasionalmente ALCOL) è strettamente legata alla sicura appartenenza del campione di urina al soggetto considerato (catena di custodia). Da questa necessità, e solo per i soggetti sottoposti a restrizione residenziale ma forniti di permessi settimanali, è nato un documento (O. di S. n°227 del 09/12/1997 emesso dalla Casa di Reclusione di Padova) riguardante la raccolta, identificazione e trasporto dei campioni di urina al Laboratorio di Analisi. Questa procedura è stata redatta unitamente tra il Servizio Tossicodipendenze n°2 (SERT 2) di Padova, la Casa di Reclusione di Padova e il Laboratorio di Analisi dell'Ospedale Geriatrico di Padova. Dopo i primi tre anni dalla sua applicazione abbiamo voluto verificare se l'applicazione di questa procedura è risultata efficace oppure no.

MATERIALI E METODI

In sintesi il contenuto del documento riguarda le modalità di raccolta (a vista) del campione di urina con frequenza non programmata, le modalità di sigillatura del contenitore (provetta), le indicazioni per una corretta e completa compilazione della scheda di accompagnamento dei campioni, le modalità di trasporto e consegna di questi al laboratorio analisi, la spedizione delle risposte e la conservazione dei campioni di urina risultati positivi. Inoltre, a conferma dell'idoneità del campione raccolto viene eseguito anche il dosaggio della creatinina urinaria.

RISULTATI

Nei tre anni considerati (1998, 1999, 2000) sono pervenute 153 richieste (73, 40 e 44 rispettivamente) relative a 400 soggetti (216, 59 e 125) per un totale di 2018 test eseguiti (1087, 299 e 632). Le positività riscontrate sono state complessivamente 26 (1.3 % del totale dei test) così distribuite (Oppiacei 11, Metadone 9 e Cannabinoidi 6). Escludendo i cannabinoidi non tutte erano giustificate da contemporanea terapia (metadonica, antitussiva o simile); infatti esattamente il 50% delle positività era attribuibile ad un probabile comportamento scorretto del soggetto durante il permesso premio. Ciò è stato possibile stabilirlo in quanto, in fase di stesura della procedura, il Laboratorio di Analisi ha suggerito che nella scheda di accompagnamento di ogni campione fosse riportata qualsiasi eventuale terapia in atto.

Nel totale delle richieste pervenute, solo 8 (5.2 %) sono risultate non conformi per: mancanza di una delle firme previste (1), mancanza data di raccolta (2), altre non conformità (5). Le creatinine urinarie eseguite sono risultate >45.0 mg/dL (limite consigliato in letteratura) tranne in 10 campioni (valore medio 27.6 mg/dL con ds 11.3; range 10.4 – 43.1 mg/dL).

CONCLUSIONI

Per il buon esito di un esame tossicologico eseguito su un campione di urina, anche a solo scopo clinico, non si può trascurare l'importanza della catena di custodia, soprattutto quando i dosaggi richiesti riguardano situazioni particolari come i detenuti in permesso premio. Riguardo la nostra esperienza in questi primi tre anni di applicazione della procedura abbiamo subito un'unica contestazione da parte di un detenuto. La conferma dell'analisi eseguita con metodologia GC/MS presso il Laboratorio dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Padova, è stata indirettamente anche una conferma dell'utilità, e quindi dell'efficacia, della nostra procedura.

IL LABORATORIO DI BIOCHIMICA CLINICA NEL MONITORAGGIO DELLE DROGHE D'ABUSO

G.Cosio, A.Vodovà, G.Bortolameolli, A.Castellini, G.Petermayr, M.Floreani
Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Sanitaria di Bolzano

Scopo del lavoro

L'efficacia della terapia metadonica e del programma terapeutico-riabilitativo non può prescindere dal riscontro laboratoristico di alcuni metaboliti di droghe d'abuso ricercati su campioni urinari di pazienti tossicodipendenti. Nel nostro laboratorio afferiscono tutti i campioni provenienti dal SERT dell'Azienda Sanitaria di Bolzano. Scopo del presente lavoro riportare i risultati relativi a 1328 campioni urinari analizzati nei mesi di maggio-giugno 2001.

Materiali e Metodi

Le sostanze stupefacenti ricercate sono: oppiacei, metadone, amfetamine, cocaina, cannabinoidi e benzodiazepine¹. E' stato utilizzato per l'analisi il dosaggio immunoenzimatico² di screening semiquantitativo EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) II Plus che si basa sulla competizione per i siti di legame per l'anticorpo tra la droga presente nel campione e la droga marcata con l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH), applicato sullo strumento MEGA della ditta Dade-Behring. Su ogni campione inoltre è stato eseguito il dosaggio della creatinina urinaria (metodo di Jaffè).

Risultati

Dei 1328 campioni analizzati 76 (5.72%) presentavano valori di creatinina non compatibili con le normali concentrazioni urinarie. Tra i pazienti 630 (47.43%) sono risultati positivi agli oppiacei, 1124 (84.63%) al metadone, 2 (0.15%) agli amfetaminici, 143 (10.76%) alla cocaina, 363 (27.33%) ai cannabinoidi e 260 (19.57%) alle benzodiazepine. In particolare 99 (7.45%) pazienti erano positivi contemporaneamente ad oppiacei e cocaina, 155 (11.67%) ad oppiacei e cannabinoidi, 81 (6.09%) ad oppiacei e benzodiazepine, 1 (0.07%) ad oppiacei, cocaina, cannabinoidi e benzodiazepine; dei due pazienti positivi agli amfetaminici 1 (0.07%) era positivo ai cannabinoidi ed 1 (0.07%) a cocaina e cannabinoidi.

Conclusioni

Nella disintossicazione e nella riabilitazione con farmaci l'analisi chimico-clinica costituisce, a nostro avviso, l'indispensabile premessa all'inizio e alla continuazione del trattamento. Inoltre i dosaggi delle droghe d'abuso sono indispensabili nel corso di indagini epidemiologiche, per la individuazione delle sostanze stupefacenti di maggior rilevanza sociale.

Bibliografia

¹Ellenhorn MJ, Barceloux DG. Medical Toxicology. New York, NY: Elsevier Science Publishing Company, Inc; 1988:689-717.

²Oellerich M. Enzyme immunoassays in clinical chemistry: present status and trends. J Clin Chem Clin Biochem 1980; 18:197-208.

UN SISTEMA HPLC DI SCREENING NEL LABORATORIO DI CHIMICA CLINICA : SOLUZIONE RAPIDA DI ALCUNI PROBLEMI DI TOSSICOLOGIA

G. Dall'Olio, B. Viero, M. Lovato, G. Soffiati

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "S.Bortolo", Vicenza

INTRODUZIONE

La ricerca di sostanze d'abuso nell'urina prevede metodi di screening, di solito immunochimici, e la successiva conferma dei risultati positivi. Molti laboratori di chimica clinica per il loro pannello di indagini chimico-tossicologiche (oppiacei, cocaina, cannabinoidi, amfetamine, metadone), rivolto ai Servizi per le Tossicodipendenze (SERT) o al Pronto Soccorso (PS), forniscono la sola risposta immunometrica per classe di sostanze che, tralasciando la problematica della conferma, può essere talvolta fuorviante al momento dell'interpretazione dei risultati. In questa ottica vengono qui evidenziati alcuni problemi di tossicologia che potrebbero essere facilmente risolti con un sistema HPLC dedicato per lo screening di farmaci e sostanze d'abuso.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati con il sistema HPLC di screening REMEDI (Bio-Rad) tutti i campioni di urina provenienti dal Pronto Soccorso e quelli del SERT con il risultato del test immunometrico contestato dagli afferenti al servizio o non rispondente alle aspettative degli operatori. Le conclusioni sono state verificate con gli operatori interessati. Il tempo di analisi, dall'iniezione tramite autocampionatore (1mL di urina + 200 µL di una miscela di due standard interni) alla stampa del cromatogramma, è di 19 minuti. L'identificazione dei picchi viene effettuata dal computer dello strumento tramite il tempo di ritenzione rispetto agli standard interni e allo spettro UV della molecola (205 - 300 nm con rivelatore a serie di diodi).

RISULTATI: Tipologie di casi risolti con HPLC di screening

| N | IMMUNOMETRIA PANNELLO SCREENING | HPLC SOSTANZE RILEVATE | OSSERVAZIONI | CONCLUSIONI (VERIFICATE) |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---|--|
| 1 | Positivo amfetamine | fenilpropanolamina | Falso positivo | Assunzione decongestionante nasale (Rhindecon ^R) |
| 2 | negativo | MDA, MDMA | Falso negativo | Assunzione Ecstasy |
| 3 | Positivo metadone | Metadone (assenti metaboliti) | Campione adulterato | Metadone aggiunto al campione (non assunto) |
| 4 | / | Naltrexone (assente naltrexolo) | Campione adulterato | Naltrexone aggiunto al campione (non assunto) |
| 5 | Positivo oppiacei | Diidrocodaina | Risultato fuorviante | Assunzione sedativo della tosse (Cardiazol-Paracodina ^R) |
| 6 | Positivo oppiacei | Codeina | Risultato fuorviante | Assunzione antidolorifico (Co-Efferalgan ^R) |
| 7 | Positivo oppiacei | 6-MAM | Possibilità di individuare la droga assunta | Assunzione eroina |

CONCLUSIONI

La risposta del solo test immunometrico, avrebbe indotto, nella tipologia dei casi riportati, valutazioni errate da parte dei sanitari del SERT o del PS. La possibilità di rilevare i metaboliti di una classe di sostanze può dare un tangibile aiuto nella verifica della compliance per alcuni farmaci utilizzati nei SERT per lo svezzamento del tossicodipendente (Metadone, Naltrexone) ed una esatta identificazione delle molecole assunte, alcune presenti in farmaci di uso corrente (codeina, diidrocodaina). E' possibile inoltre individuare, dalla presenza di "metaboliti marker" (es: 6-Monoacetilmorfina (6-MAM)), il tipo di droga assunta (eroina).

La soluzione di questi problemi, da non sottovalutare, può essere ottenuta rapidamente (mezz'ora) con un sistema HPLC dedicato allo screening di farmaci e sostanze d'abuso, che non richiede e i lunghi tempi di stabilizzazione e lavaggio della colonna e il pretrattamento del campione di urina. E' però necessaria l'opera di un esperto per la interpretazione dei cromatogrammi, come peraltro per altri sistemi HPLC.

UN CASO DI INTERFERENZA DA FATTORE REUMATOIDE SUL DOSAGGIO DELLA TROPONINA I

D. Rubin, R.De Luca^o, P. Cappelletti, M. Cassin*, G.L. Nicolosi*.

Laboratorio di Patologia Clinica ° Microbiologia-Immunologia (Dipartimento di Medicina di Laboratorio), * Unità Operativa di Cardiologia
Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli" Pordenone

Scopo del lavoro

Le troponine cardiache, riconosciute come i marcatori più sensibili di lesione miocardica, non indicano necessariamente un meccanismo ischemico come causa del danno. Accanto alla lista sempre più numerosa dei moventi non ischemici di elevazione delle troponine, devono essere tenuti presenti anche i problemi analitici.

Scopo del lavoro è stato l'identificazione di possibili interferenze analitiche su una elevazione persistente (12 ng/mL) di troponina I (TnI), con CK-MB sempre nella norma, in un maschio di 74 anni, affetto da sindrome mielodisplastica e sottoposto recentemente ad impianto di PMCA per malattia aritmica atriale bradi-tachicardica, trasferito in Unità Coronarica in seguito alla comparsa di dolore toracico anteriore prolungato con caratteristiche sospette per ischemia miocardica. Gli approfondimenti diagnostici evidenziavano un ECG non diagnostico per la presenza di PMCA ed un esame ecocardiografico compatibile con cardiopatia sclero-ipertensiva con normale funzione di pompa del ventricolo sinistro. La presenza di valori elevati e costanti di TnI, in assenza di evidenza di ischemia, hanno fatto sospettare una possibile falsa positività da interferenza analitica.

Materiali e metodi

La TnI è stata misurata con metodo immunoenzimatico su Dimension RxL (DADE-Behring). E' stata saggiata la possibile interferenza da anticorpi eterofili (HA) mediante trattamento con reattivo bloccante (HBR Scantibodies Laboratory). Il fattore reumatoide (RF) è risultato >1500 UI/mL (metodo nefelometrico su BNA II DADE-Behring). Pertanto un campione del paziente è stato trattato con polietilenglicole (PEG 6000) alla concentrazione finale del 2% e 3%. Dopo precipitazione overnight a 4 C e centrifugazione è stata dosata la TnI sul precipitato ridisciolto e sul soprannatante. E' stato inoltre dosato RF sulle stesse frazioni (Waalser-Rose modificata).

Risultati

Il confronto dei risultati di TnI prima e dopo il trattamento con HBR ha escluso la presenza di anticorpi eterofili nel campione. La precipitazione parziale (PEG 2%) o pressochè totale (PEG 3%) di RF determina un livello di TnI misurata sul sovranatante pari a 0.34 – 0.37 ng/mL. I valori patologici di TnI sono stati considerati, quindi, secondari ad una probabile interferenza da parte di RF.

Discussione

Mentre erano in corso gli approfondimenti relativi alla evidenza di HA e/o di interferenza da RF il paziente è stato ricoverato nuovamente per dolore toracico associato a valori elevati di TnI. Le interferenze analitiche da HA o RF non sono frequenti nella pratica clinica (nella nostra esperienza 2 e 1 caso, rispettivamente, su circa 4000 pazienti) e tuttavia esse devono essere valutate sul proprio metodo, illustrate al clinico e segnalate al paziente.

L'ACE nei pazienti con sarcoidosi in fase attiva

Innocenti C., Turini P., Lucchetti A., *Fazzi P., **Monti S., *Troilo S., Innocenti B., Rossi L.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, Azienda Ospedaliera Pisana

*Dipartimento Cardiotoracico, Sezione Pneumologia, Università di Pisa

**Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Pisa

Scopo del lavoro

La sarcoidosi è una malattia sistemica con manifestazioni cutanee e viscerali a decorso cronico, prodotta da un agente patogeno non identificato. Livelli circolanti di Lisozima, D Dimero e ACE (Angiotensiv Converting Enzyme) sono stati descritti recentemente come markers della sarcoidosi in fase attiva. Risulta inoltre che l'aumento di ACE nel siero è in rapporto con il grado di attività della malattia, in quanto in corso di efficace trattamento cortisonico si possono rilevare netti cali dell'attività enzimatica. Scopo di questo lavoro è stato l'assegnare una reale utilità a questi indicatori, ed in particolare all'ACE, nel monitoraggio della sarcoidosi.

Materiali e metodi

32 pazienti, non in trattamento steroideo, con una precedente storia di sarcoidosi (età media 42 ± 9 anni, 19 femmine, 23 maschi), sono stati sottoposti ad una valutazione standard che includeva una visita medica generale, un test di funzionalità polmonare (PFTs) con la misurazione della capacità di diffusione al CO (DLCOsb), RX del torace e scintigrafia polmonare con Gallio 67. La captazione parenchimale con Gallio 67 è stata valutata con metodo di Line (score 50-400); successivamente è stata valutata la captazione dell'ilo polmonare (score 0-100). In questi pazienti sono stati eseguiti dosaggi per la determinazione di Lisozima, D Dimero e ACE. I primi due tests sono stati eseguiti in altro laboratorio, per l'ACE è stata utilizzata una metodica colorimetrica manuale (Diacron), adattata ed automatizzata su analizzatore Modular (Roche Diagnostici). Grazie a questo accorgimento è possibile evitare lunghe e noiose preparazioni manuali ed eseguire il test in meno di 20 minuti.

Risultati

Dai risultati della scintigrafia polmonare sono risultati positivi per sarcoidosi in fase attiva 17 (53%) dei 32 pazienti. Questi differivano dagli altri prevalentemente per sintomatologia respiratoria, valutazione radiografica e modificata DLCO. Dei 17 pazienti positivi, 4 (23%) presentavano un D Dimero positivo, 9 (53%) il lisozima superiore ai valori normali. Diversamente la scintigrafia polmonare correlava con i livelli di ACE circolanti ($R=0.7$, $P=0.004$).

Discussione e conclusioni

La variazione dei livelli di Lisozima e D Dimero non è sensibilmente significativa nell'indicare una sarcoidosi in fase attiva, a differenza dell'ACE, che oltre a fornire un'indicazione sulla progressiva attività, risulta essere un'ottimo indicatore nel riflettere la massa del granuloma attivo. L'associazione con altri parametri laboratoristici, quali il fattore reumatoide, o clinici (ipergammaglobulinopatia generalizzata) ne fanno un buon marcatore della sarcoidosi in fase attiva.

Variazioni della proteina cationica eosinofila (ECP) in pazienti affetti da neoplasia del capo-collo

G.Pigoli°, A.M. Poli*, D. Dolci°, M. Fantini°, L. Ferrari°

° Istituto di Patologia Clinica, Az. Istituti Ospitalieri Cremona

* Divisione Medica 2°, Az. Istituti Ospitalieri Cremona

In questo lavoro sono stati valutati i livelli serici della proteina cationica eosinofila (ECP) in pazienti affetti da neoplasia del capo-collo nel corso del trattamento, in paragone con altri parametri ematologici quali : eosinofili/mm³ e linfociti/mm³; al fine di stabilire una eventuale correlazione fra la risposta alla terapia ed i livelli circolanti di ECP.

Materiali e metodi

Complessivamente sono stati studiati 14 pazienti ed i parametri sopra citati sono stati valutati per un periodo di 10 mesi secondo le seguenti cadenze:

- 1) alla diagnosi
- 2) 30 giorni dopo la terapia
- 3) in occasione dei controlli trimestrali

I pazienti venivano quindi suddivisi in due gruppi:

- a) pazienti che mostravano una buona risposta alla terapia (7/14)
- b) pazienti che mostravano una risposta parziale alla terapia (7/14)

l'ECP veniva dosata in chemiluminescenza con metodo immunometrico (Immulite, Medical System), dopo stretta osservanza delle condizioni preanalitiche raccomandate (centrifugazione a 1100 g, 60-120 minuti dal prelievo).

Le concentrazioni linfocitarie ed eosinofile erano determinate mediante l'impiego dell'analizzatore automatico SE-9500 (Dasit), cui seguiva controllo morfologico-microscopico dei campioni.

Risultati

Nel gruppo dei pazienti che presentavano buona risposta al trattamento (in cui cioè non vi era evidenza clinica e strumentale della presenza della malattia), i livelli di ECP risultavano più bassi rispetto al gruppo di pazienti che mostravano una risposta parziale al trattamento ($p = 0,01$), tale differenza fra i gruppi risultava costante per tutto il periodo d'osservazione. In nessuno dei pazienti, indipendentemente dal gruppo di appartenenza, sono state evidenziate variazioni significative delle concentrazioni eosinofile e linfocitarie.

Discussione e conclusioni

L'esiguità della popolazione studiata, unitamente alle differenze esistenti fra i tipi di trattamento (chirurgia, radio-chemioterapia...) non permettono di definire una correlazione fra livelli circolanti di ECP e risposta terapeutica relativamente ad ogni singolo paziente, tuttavia i risultati dello studio confermano quanto già rilevato nel corso di nostre precedenti esperienze riguardanti neoplasie della mammella con e senza metastasi ossee, secondo cui i livelli serici delle proteine granulari eosinofile risultano più elevati nei pazienti non responsivi al trattamento.

PRESENZA DI ANTICORPI ANTI-P53 NEL SIERO DI PAZIENTI CON TUMORE DELLA LARINGE: PRIMA E DOPO IL TRATTAMENTO CHIRURGICO E NELLE RECIDIVE

M.M. Corsi^{ab}, P. Tredici^c, L. Porcaro^a, M. Ruscica^a, E. Arisi^c, L. Pignataro^c

^aIstituto di Patologia Generale, Laboratorio di Patologia Clinica, Facoltà di Medicina, Università degli Studi di Milano; ^bCentro di Studio sulla Patologia Cellulare-C.N.R., Milano; ^cDipartimento di Scienze Otorinolaringoiatriche, Ospedale Maggiore IRCCS Policlinico, Facoltà di Medicina, Università degli Studi di Milano.

Scopo del lavoro

Il gene soppressore tumorale p53 è alterato in circa il 50% dei tumori umani. Alterazioni del gene per la p53 o l'accumulo della proteina p53 stanno ad indicare una prognosi infausta per i pazienti portatori di tumore. Le alterazioni del gene p53 possono indicare la resistenza di alcuni tumori alla chemioterapia. Inoltre alterazioni della p53 possono essere scoperte molto rapidamente durante l'oncogenesi. Da queste considerazioni si evince che poter analizzare tali alterazioni sia di cruciale importanza nella rapida diagnosi, nella scelta e nel monitoraggio della terapia.

Materiali e Metodi

L'analisi delle alterazioni della p53 possono essere effettuate sia con tecniche molecolari, sia immunocitochimiche, che anche con tecniche sierologiche. L'analisi sierologica può individuare gli anticorpi anti-p53 presenti nel siero di pazienti con una risposta immunitaria contro un abnorme livello di proteina p53 all'interno delle cellule tumorali. Inoltre, gli anticorpi anti-p53 sono un risultato indiretto di una "missense point mutation" del gene p53. Per questo scopo abbiamo utilizzato un kit anti-p53 ELISA (PharmaCell, IL-Instrumentation Laboratory, Milano, Italia). Il nostro studio ha interessato 15 soggetti controllo, 22 soggetti portatori di tumore alla laringe, e 12 soggetti operati per tumore alla laringe portatori di recidiva.

Risultati

Per quanto concerne i soggetti portatori di recidiva (12), dei quali avevamo uno studio molecolare della mutazione del gene p53, abbiamo notato in 8 soggetti la presenza di anticorpi anti-p53. Tra i soggetti portatori di tumore operati (22), 15 di questi presentano, prima del trattamento chirurgico, la presenza di anticorpi anti-p53, i quali tendono a diminuire dopo l'intervento (1 settimana), e al follow-up di due mesi. La significatività dei dati è stata presa in considerazione quanto $p < 0.05$. Per la statistica è stato utilizzato il test di Mann-Whitney.

Discussione e Conclusioni

I marcatori tumorali possono essere considerati, almeno dal punto di vista biochimico clinico, come sostanze che possono essere misurate quantitativamente nei fluidi biologici per indicare la presenza, la localizzazione ed estensione dei tumori maligni. Noi riteniamo che il dosaggio degli anticorpi anti-p53 possa essere considerato come un marker sierologico nei tumori della laringe.

LA SPETTROMETRIA DI MASSA IN UNO STUDIO PRELIMINARE DI AGE-PEPTIDI

A. Lapolla^a, D. Fedele^a, A. Senesi^a, N.C. Aricò^a, R. Seraglia^b, H. Astner^b, M.Fedrigo^b and P.Traldi^b

^aDipartimento di scienze Mediche e Chirurgiche, Cattedra di Malattie del Metabolismo, Università di Padova

^bCNR/CSSRCC Laboratorio di Spettrometria di Massa, Padova

Scopo del lavoro

I prodotti di glicazione avanzata (AGE) di sistemi proteici sono stati indicati come responsabili di complicanze croniche della malattia diabetica. Le proteine glicate per via non enzimatica vengono metabolizzate dal sistema macrofagico in AGE-peptidi, normalmente escreti per via renale. Nel diabete e nell'insufficienza renale si è osservato incremento del livello plasmatico di tali composti, con l'insorgere o il peggioramento di complicanze, da correlarsi alla loro elevata reattività. Scopo di questo lavoro è stata la verifica della capacità analitiche del sistema HPLC/MS nella identificazione strutturale di AGE-Peptidi, prodotti da digestione enzimatica di HSA glicata in vitro.

Materiali e Metodi

La glicazione in vitro di HSA (100 mg/mL) è stata effettuata con glucosio (0.5M) in condizioni pseudofisiologiche. I campioni sono stati prelevati a 0 e 90 gg di incubazione. HSA di controllo è stata incubata nelle stesse condizioni senza l'aggiunta di glucosio. Il livello di glicazione della proteina glicata è stato calcolato mediante misure MALDI/MS. Gli AGE-peptidi sono stati ottenuti da digestione con proteinasi K di HSA glicata. I peptidi di controllo sono stati ottenuti da una analoga digestione di HSA di controllo. I campioni così ottenuti sono stati analizzati mediante HPLC con diversi sistemi di rivelazione (UV a 280 e 350 nm, electrospray mass spectrometry (ESI/MS) ed ESI/MS/MS)

Risultati

I cromatogrammi dei prodotti di digestione enzimatica di HSA glicata e di controllo risultano particolarmente complessi. Con rivelazione UV si nota un chiaro aumento dell'assorbimento nel primo caso, confermato dai dati di spettrometria di massa, che permette di individuare specie di AGE-peptidi con masse di 573, 463, 668, 613, 622, 649, 603, 910, 456, 779, 913, 1180, 1149, 767 Da. Esperimenti di MS/MS hanno mostrato che tali composti sono di natura peptidica e contengono sottostrutture derivanti dal glucosio.

Discussione e conclusioni

L'analisi dettagliata dei dati ottenuti da misure ESI/MS ha permesso di ottenere una indicazione definitiva sulla distribuzione dei pesi molecolari di AGE-peptidi, nell'intervallo 600-1200 Da, totalmente assente in letteratura. La natura degli AGE peptidi delle specie identificate è stata confermata mediante esperimenti MS/MS. I risultati ottenuti con HPLC/MS hanno mostrato la possibilità di ottenere interessanti risultati strutturali su questa classe di composti, di notevole interesse biomedico.

Tuttavia riteniamo che un approccio più specifico sia necessario per intraprendere un analogo studio su AGE-peptidi in vivo. Per tale scopo misure di massa accurate, portanti alla individuazione delle composizioni elementari delle varie specie, sembrano altamente promettenti e studi futuri saranno basati su tale tecnica.

Le immunoglobuline come indicatore predittivo di sepsi nel neonato pretermine

Luchetti B., Lucchetti A., Innocenti B., *Cuttano A., *Ghirri P., Rossi L.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, Azienda Ospedaliera Pisana
*U.O. Neonatologia

Scopo del lavoro

Nel neonato, alla nascita, le gammaglobuline sono costituite quasi esclusivamente da IgG (che attraversano la placenta) mentre ci sono poche o nessuna IgA o IgM (che non attraversano la placenta) perché il feto normalmente è protetto da stimoli antigenici. Poiché le IgG sono di origine materna hanno una breve emivita (20-30 giorni) e la loro concentrazione nel siero diminuisce rapidamente nei primi mesi di vita raggiungendo il livello più basso tra il 2° e il 4° mese (ipogammaglobulinemia fisiologica) quando inizia la secrezione attiva. Le IgM aumentano invece gradualmente dopo la nascita, raggiungendo il valore degli adulti a circa un anno di età. C'è scarso trasporto di IgG materne al feto prima di 32 settimane (il trasporto è inizialmente passivo e solo successivamente diventa attivo, con piena efficienza solo dopo 26 settimane) e questo spiega i valori significativamente più bassi delle concentrazioni sieriche di IgG alla nascita nei neonati < 32 settimane (250-750 mg/dl contro 550-1320 mg/dl dei neonati a termine). Sembra accertato che i neonati con concentrazioni sieriche di IgG alla nascita inferiori a 400 mg/dl hanno un rischio più elevato di contrarre infezioni postnatali sia precoci che durante il resto della degenza e quindi questi neonati sono quelli che maggiormente potrebbero trarre vantaggio dall'uso profilattico o terapeutico della somministrazione di immunoglobuline. Il dosaggio di queste proteine in regime di urgenza, associato alla determinazione della Proteina C Reattiva e ai parametri ematologici, forniscono al clinico indicazioni rapide per interventi diagnostici efficaci e tempestivi.

Materiali e metodi

Il dosaggio delle Immunoglobuline viene eseguito, così come la Proteina C Reattiva e gli altri parametri biochimici, sull'analizzatore automatico Modular (Roche Diagnostici). Con questa dotazione strumentale siamo in grado di fornire una risposta (comprensiva di eventuali ripetizioni) in un tempo massimo di circa 40 minuti.

Risultati

Una concentrazione di IgM alla nascita maggiore di 20 mg/dl è considerata anormale e può essere segno di sospette infezioni intrauterine; un livello elevato di IgM potrebbe essere il risultato del passaggio di sangue materno nella circolazione fetale, i livelli di IgA dovrebbero superare quello delle IgM rispecchiando il rapporto IgA/IgM nel sangue materno, inoltre la concentrazione delle IgM ripetuta dopo 3-4-giorni diminuirebbe significativamente nel caso di trasfusione materno fetale, mentre aumenterebbe se le IgM fossero attivamente secrete dal neonato.

Discussione e conclusioni

Le infezioni perinatali sono una delle cause più importanti di mortalità del neonato. La difficoltà di individuare una sintomatologia chiara o dei sintomi specifici rendono la diagnosi difficile, in assenza di parametri laboratoristici che supportino il clinico nella scelta di una strategia terapeutica conveniente ed evitino un trattamento antibiotico inutile in bambini che non hanno contratto l'infezione. In attesa di una diagnosi sicura (e delle colture microbiologiche), l'abbinamento PCR - Immunoglobuline rappresenta un'ottimo indice predittivo negativo nell'individuare una possibile sepsi neonatale.

IMPORTANZA DIAGNOSTICA DELL' ELETTOFOCUSING DI IGG LIQUORALI NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIATA DI SCLEROSI MULTIPLA.

M. Foco^a, V. Bianchi^a, M. Melato^b, R. Dericci^a, C. Arfini^a

^aLaboratorio Analisi; ^bDivisione di Neurologia "Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo" Alessandria

Introduzione e Scopo del lavoro

La grande importanza diagnostica della comparsa nel liquor di bande oligoclonali in molte patologie del sistema nervoso, tra cui la sclerosi multipla, rende la tecnica di elettrofocalizzazione di estrema importanza per la sua alta sensibilità nell'evidenziare le immunoglobuline G.

Scopo della ricerca è confermare la validità di tale tecnica elettroforetica per la rilevazione precoce delle IgG, le sole che compaiono fin dall'esordio della malattia e quindi come mezzo utile per una diagnosi differenziata.

Materiali e Metodi

Sono stati analizzati 160 campioni, arrivati alla nostra attenzione con il dubbio diagnostico di sclerosi multipla, di liquor nativo proveniente da pazienti del reparto di Neurologia sia del nostro nosocomio che di quelli di aree geografiche limitrofe utilizzando il kit Titan Gel IFE Helena che permette di separare le proteine in base al loro punto isoelettrico. Il tracciato è interpretato visivamente comparando le bande nel siero e nel liquor.

Risultati

I risultati che si sono ottenuti sono i seguenti:

- 27 campioni hanno dato esito positivo alla ricerca, di bande oligoclonali liquorali, 24 di questi hanno trovato conferma diagnostica di sclerosi multipla, mentre per 3 campioni si sono diagnosticate altre patologie (meningioma, encefalomiopatia e vasculopatia)
- 133 casi hanno dato esito negativo alla ricerca delle bande oligoclonali liquorali e tra questi solo 2 sono risultati affetti da sclerosi multipla, mentre per i restanti 131 è stata confermata la negatività anche clinicamente.

Discussione e Conclusione

I risultati ottenuti evidenziano che l'elettrofocusing è una tecnica di laboratorio elettiva per la rilevazione precoce delle bande oligoclonali di IgG liquorali e al contempo un utile mezzo per la diagnosi differenziale di sclerosi multipla.

Sarebbe interessante approfondire il significato dell'interpretazione visiva e quindi soggettiva dei dati ottenuti per realizzare sistemi interpretativi di facile e rapida consultazione che portino a risultati sicuri e certi con la possibilità di ampliare l'ambito diagnostico.

Titolo

Dialisi peritoneale e stima delle proteine presenti nel dialisato, per mezzo del test classico per elettroforesi e confronto con un test per P.M. in SDS-Agarosio.

Autori

D. Innocenti *, A. Ciapini *, G.M. Caselli **, A. Mannarino **, G. Spatoliatore **, N. Fiaschi***

* U.O.Diagnostica di laboratorio Osp. Nuovo S. G. di Dio – FI** U.O.Nefrologia e dialisi Osp. Nuovo S. G. di Dio – FI***U.O. Diagnostica di laboratorio Osp. S. M. Annunziata-FI

Scopo

Scopo del presente lavoro è quello di dimostrare la maggiore validità in termini di sensibilità e di specificità del test con separazione delle proteine plasmatiche, perdute giornalmente con la soluzione dializzante durante dialisi peritoneale, per P.M. in alternativa a quello per sola carica elettrica.

Materiali e metodi

Per lo studio condotto sul dialisato delle 24|ore di 10 pz. in trattamento dialitico peritoneale, di ambo i sessi, sono stati utilizzati i kits HR e Proteinurie della Sebia con lo strumento Hydrasys. Con il kit HR le proteine vengono separate per carica elettrica netta, mentre con il kit Proteinurie in un eccesso di detergente anionico SDS, le proteine sono convertite in complessi proteine\SDS dove queste assumono la stessa conformazione e carica elettrica per unità di massa; la successiva migrazione su supporto agarosio ad effetto setaccio, consente la separazione in base al P.M..

Lo spettro di P.M. preso in studio varia da 12 a 1000 KD. Con il kit HR si è proceduto alla stima delle aree di migrazione mentre con il kit Proteinurie le singole proteine sono state identificate in riferimento ad uno standard di "massa molecolare". Le relative quantificazioni sono state eseguite con lettura scanner-densitometrica (sistema Phoresis Sebia) e valutate in g/die.

Risultati

| Elettroforesi per carica elettrica : aree | | | | | | | |
|---|---------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| Nr. 10 | Albumi. | Alfa1 | Alfa2 | Beta1 | Beta2 | Gamma | g / die |
| Val. Min. | 3.19 | 0.14 | 0.27 | 0.34 | 0.33 | 0.43 | 4.7 |
| Media | 7.05 | 0.43 | 0.88 | 0.79 | 0.97 | 1.48 | 11.6 |
| Val. Max | 13.4 | 1.18 | 1.71 | 1.58 | 1.94 | 3.47 | 23.28 |

| Elettroforesi per peso molecolare : proteine specifiche con P.M. < Albumina (15 /66 KD) | | | | | | | |
|---|----------|------|------------|---------|--|--|---------|
| Nr. 10 | Lisozima | RBP | Alfa1 mic. | Dim KVL | | | g / die |
| Val. Min. | 0.02 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | | | 0.07 |
| Media | 0.15 | 0.06 | 0.14 | 0.15 | | | 0.50 |
| Val. Max | 0.40 | 0.08 | 0.31 | 0.41 | | | 1.20 |

| Elettroforesi per peso molecolare : proteine specifiche con P.M. > Albumina (66 /971 KD) | | | | | | | |
|--|---------|------|------|------|------|---------|---------|
| Nr. 10 | Albumi. | Trf | IgG | IgA | Hpt | IgM+α2M | g / die |
| Val. Min. | 3.06 | 0.09 | 0.34 | 0.22 | 0.23 | 0.22 | 4.16 |
| Media | 7.78 | 0.56 | 1.15 | 0.69 | 0.78 | 0.71 | 11.7 |
| Val. Max | 14.56 | 1.71 | 2.50 | 1.91 | 1.81 | 2.29 | 24.7 |

Discussione e Conclusioni

La osservazione dei dati dimostra come il metodo per PM, di facile utilizzo ed economicità, fornendo maggiori informazioni sulle singole proteine scambiate tra comparto ematico e soluzione di dialisi in pz. in trattamento dialitico peritoneale, contribuisca ad una migliore comprensione dei complessi meccanismi fisiopatologici di selettività della membrana peritoneale.

Ciò potrebbe tradursi in interventi terapeutici mirati nel singolo pz. volti ad assicurare un più adeguato equilibrio omeostatico e nutrizionale.

INTERVALLO DI RIFERIMENTO PER IL RECETTORE SOLUBILE PER LA TRANSFERRINA CON BN II, IMMAGE, INTEGRA E LIAISON: STUDIO PRELIMINARE

A.Ferrari, R.M.Dorizzi, Righetti G

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera di Verona, Verona

Scopo del Lavoro

E' stato segnalato anche recente (Van den Bosch G, Van den Bossche J, Wagner C, De Schouwer P, Van De Vivere M, Neels H. *Determination of Iron Metabolism-related reference values in a healthy adult population. Clin Chem* 2001; 47: 1465-7) che l'intervallo di riferimento per il recettore solubile per la transferrina (sTfR) ottenuto impiegando metodi ed analizzatori diversi è poco comparabile. Gli autori hanno calcolato un intervallo di riferimento (IR) di 0.83–1.76 mg/L (Dade Behring) e riferiscono altri intervalli riportati in letteratura: Vernet and Doyen: 0.78 –1.38 mg/L; TfR ELISA (Ramco): 3–8.2 mg/L; Quantikine ELISA (R&D Systems) e Clinigen (Amgen Diagnostics): 0.85–3.05 mg/L; IdeA IEMA (Orion):1.1–3.3 mg/L; Tinaquant (Roche): 2.16–4.54 (maschi) e 1.79–4.63 mg/L (femmine). Nel nostro laboratorio è stato calcolato l'intervallo di riferimento per il sTfR usando 4 metodi commerciali diversi.

Materiali e Metodi

E' stata misurata la concentrazione di sTfR in 129 soggetti apparentemente sani (maschi età: 30 ± 6 anni) impiegando quattro diversi analizzatori: Integra (Roche), Liaison (Byk Sangtec) BNII (Dade Behring) e Immage (Beckman Coulter), e i metodi ed i reagenti forniti dalle aziende produttrici. I risultati ottenuti con Integra, BNII e Immage sono stati utilizzati nell'unità di misura raccomandati dal produttore mentre i risultati (in nmol/L) ottenuti con il metodo Liaison sono stati convertiti in mg/L. Gli intervalli di riferimento sono stati calcolati secondo la tecnica proposta da Linnet e quella proposta da Kairisto.

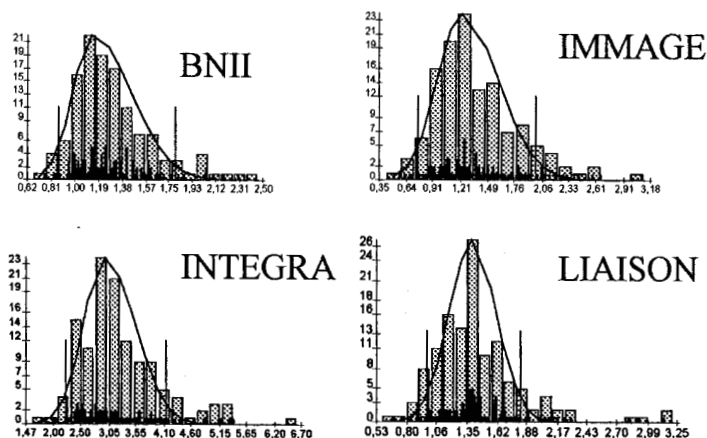
Risultati

In tabella sono mostrati i risultati relativi ai diversi analizzatori

| Unità di misura | <i>Integra</i> mg/L | <i>Liaison</i> mg/L | <i>BN II</i> mg/L | <i>Image</i> mg/L |
|----------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| mediana | 3.10 | 1.38 | 1.24 | 1.27 |
| 2.5 percentile (Linnet) | 2.22 | 0.87 | 0.86 | 0.77 |
| 97.5 percentile (Linnet) | 4.99 | 2.09 | 2.00 | 2.19 |
| 2.5 percentile (Kairisto) | 2.23 | 0.99 | 0.88 | 0.77 |
| 97.5 percentile (Kairisto) | 4.13 | 1.84 | 1.80 | 2.00 |

Discussione e conclusioni

Gli intervalli di riferimento prodotti con le due tecniche di calcolo sono simili. I risultati di Liaison, BNII e Immage sono comparabili mentre l'analizzatore Integra fornisce risultati diversi (anche se l'intervallo ottenuto è in accordo con quello raccomandato dal produttore).



IL SISTEMA SI: LA CHIAVE VERSO LA STANDARDIZZAZIONE O LA PREMESSA VERSO IL CAOS. IL CASO DEL RECETTORE SOLUBILE PER LA TRANSFERRINA

R.M.Dorizzi, A.Ferrari, P.Brigato

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera di Verona, Verona

Scopo del Lavoro

E' oramai certo che la Direttiva 80/181 CEE del 20 dicembre 1979 per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri... ed il DPR n.802 del 12-08-1982 Attuazione della Direttiva (CEE) n 80/81 relativa alle unità di misura che disponevano l'introduzione delle Unità internazionali SI nella refertazione degli esami di laboratorio entro il 1 gennaio 2000 non sono state rispettate né in Italia né in altri paesi dell'Unione Europea (UE). Si sta verificando quindi una incerta e confusa applicazione delle raccomandazioni con effetti che oltre ad esporre a sanzioni da parte della UE espone al rischio di grossolane incongruenze ed errori. Una conseguenza di tale confusione è stata la difficile interpretazione del confronto dei risultati ottenuti nella determinazione del recettore solubile della transferrina (sTfR) impiegando quattro metodi automatici commercializzati da importanti aziende di diagnostici. Il TfR è una glicoproteina di membrana con un peso molecolare di 190 KDa formato da due subunità identiche legate da ponti disolfuro. L'sTfR è un monomero di 74 KDa, che costituisce il dominio extracellulare della molecola che subisce un clivaggio tra Arg100 e Leu 101. La concentrazione circolante del TfR è direttamente proporzionale alla concentrazione del recettore sulla membrana.

Materiali e Metodi

Nel nostro laboratorio è stata misurata la concentrazione di sTfR in 129 soggetti apparentemente sani impiegando quattro diversi metodi: Integra (Roche), Liaison (Byk Sangtec), BNII (Dade Behring) e Image (Beckman Coulter). I metodi Integra, BNII e Image sono calibrati e producono risultati espressi in mg/L mentre il metodo Liaison in nmol/L. I risultati ottenuti con il metodo usato in routine (Dade Behring) sono stati confrontati con quelli ottenuti con gli altri metodi.

Risultati

In tabella sono mostrati i risultati ottenuti con Integra, BNII e Image tal quali e quelli relativi a Liaison ottenuti dividendo i valori espressi in nmol/L per 13.51 (fattore di conversione derivante da un peso molecolare di riferimento per sTfR di 74 KDa). La differenza registrata appare di difficile interpretazione.

| | <i>Integra</i> | <i>Liaison</i> | <i>BN II</i> | <i>Image</i> |
|-----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Unità di misura | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L |
| Media | 3.40 | 1.48 | 1.38 | 1.42 |
| DS | 1.17 | 0.49 | 0.48 | 0.57 |
| ES | 0.10 | 0.04 | 0.04 | 0.05 |
| Mediana | 3.13 | 1.39 | 1.25 | 1.27 |

Discussione e conclusioni

L'interpretazione è più facile quando si dividono i risultati ottenuti con Integra per il rapporto tra il fattore di conversione 13.51 (che si ottiene considerando come PM della sTfR 74 KDa e 5.3 che si ottiene considerando come PM della sTfR 190 KDa) vale a dire le 2.55. Media, DS, ES e mediana dei risultati di Integra diventano rispettivamente 1.33, 0.46, 0.04, 1.22 mg/L ed il grafico della differenza (a destra in figura confrontato con quello ottenuto senza applicazione del fattore) cambia radicalmente di aspetto. In conclusione: apparentemente aziende diverse convertono in modo diverso unità tradizionali in unità SI nell'allestimento del metodo per la determinazione del sTfR. I nostri dati suggeriscono che Roche abbia usato come PM per calcolare la concentrazione in unità convenzionali un PM di 190 KDa (dimero) rendendo i risultati non comparabili con gli altri metodi; di converso la conversione dei risultati di Liaison è coerente con i risultati di BNII e Image solo se si considera come PM 74 KDa (monomero circolante). Una standardizzazione è sempre più urgente.

