C-01

COMPORTAMENTO DEI RETICOLOCITI A BASSO CONTENUTO DI EMOGLOBINA IN SOGGETTI CON COESISTENZA DI TRAIT β TALASSEMICO ED ANEMIA FERROPRIVA.

V. Temporin°, G. Farina°, R. Ceravolo*, M. Buttarello°
° Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Geriatrico, Padova;
* Day Hospital Ospedale Geriatrico, Padova

Scopo del lavoro

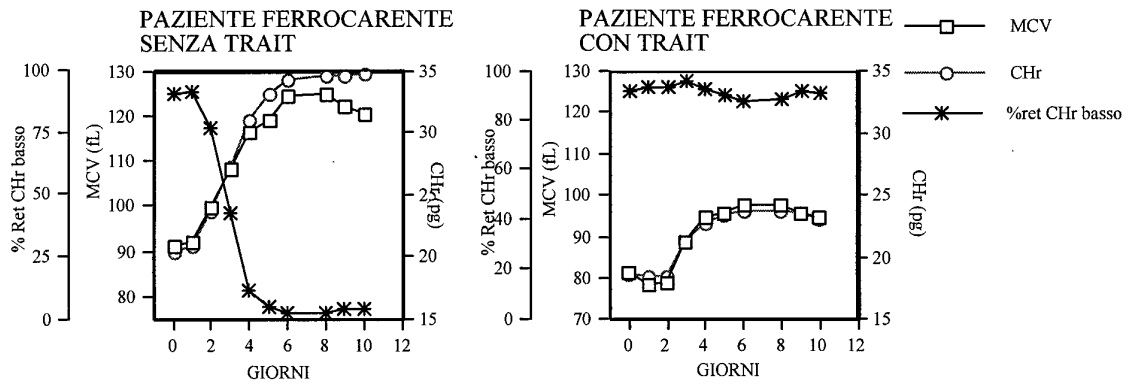
Il sistema ematologico Bayer ADVIA120, tra i vari parametri reticolocitari è in grado di fornire il volume, con metodo "light scattering" previa sfericizzazione, e il contenuto emoglobinico (CHr), calcolato come prodotto della concentrazione emoglobinica per il volume reticolocitario. I valori medi di questi parametri (MCVr, MCHr)sono stati ampiamente studiati e hanno dimostrato la loro utilità nella diagnosi di carenza funzionale di ferro e nella verifica precoce della normalizzazione dell'eritropoiesi ferrocarente a seguito di terapia marziale. Tale sistema fornisce inoltre la percentuale di reticolociti a basso contenuto emoglobinico (%CHr basso), definendoli come la "percentuale di popolazione reticolocitaria con contenuto di emoglobina cellulare inferiore a 27 pg".
Scopo di questo lavoro è evidenziare la diversità di comportamento della % di reticolociti a basso contenuto emoglobinico fra pazienti con anemia ferropriva pura e la coesistenza di trait β talassemico ed anemia ferropriva.

Materiale e metodi

Vengono riportati i dati relativi a 2 pazienti affetti da anemia ferropriva di cui uno portatore di trait β talassemico, provenienti dal Day Hospital dell'Ospedale Geriatrico di Padova, che sono stati trattati con un preparato a base di ferro (VENOFER, 100mg/die) somministrato per via endovenosa quotidianamente per la durata di 12 giorni. Per tutto il periodo di trattamento è stato eseguito il conteggio reticolocitario con i relativi indici (MCHr, MCVr, % ret CHr basso) su Bayer ADVIA120.

Risultati

La figura mostra l'andamento dei parametri studiati durante il periodo di terapia.



Discussione e conclusioni

In entrambi i casi l'andamento del MCVr ed il CHr, si dimostra sovrapponibile ed aumenta in modo significativo già dal terzo giorno di terapia raggiungendo il plateau (anche se con valori massimi piuttosto differenti) intorno alla 7-8ª giornata dall'inizio della terapia. La percentuale di reticolociti a basso contenuto Hb ha un comportamento diverso fra i due pazienti: nel paziente con la sola ferro carenza questo parametro ha un andamento speculare rispetto al CHr e MCVr, mentre nel paziente che presenta anche il trait β talassemico la percentuale di reticolociti a basso contenuto Hb, non varia con la terapia marziale. Ciò è dovuto al fatto che la soglia sotto la quale viene calcolata la percentuale di reticolociti a basso contenuto di Hb è stata fissata dal costruttore a 27 pg. Nei pazienti con trait β talassemico il contenuto di Hb nei reticolociti è fisiologicamente al di sotto di questa soglia e quindi la percentuale non varia in corso di terapia marziale. Questo parametro, immutato in seconda giornata di terapia marziale, a differenza di MCVr e CHr, dimostra la coesistenza di un eventuale trait β talassemico in pazienti ferrocarenti.

C-02

DETERMINAZIONE DELLE PIASTRINE RETICOLATE IN CITOFLUORIMETRIA: APPLICAZIONI CLINICHE NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE TROMBOCITOPENIE

G. LOBREGLIO, A. VALACCA*, P. FORESE*, T. LECCE, L. LEOPARDI, R. TORSELLO, O. MAZZOTTA, P. PENSA.

Dipartimento di Patologia Clinica, *Dipartimento di Medicina , Azienda Ospedaliera "V. Fazzi", Lecce.

Scopo del lavoro

Le piastrine reticolate (PR) conservano residui di RNA nel citoplasma in quantita' inversamente proporzionale al grado di maturazione. La determinazione delle PR e' considerata utile nell'analisi della cinetica delle piastrine e dell'attivita' trombocitopoietica midollare. Lo scopo di questo lavoro e' di valutare se il conteggio delle PR puo' essere utile nella diagnosi differenziale tra le piastrinopenie da ridotta produzione midollare e quella da eccessiva distruzione periferica.

Materiali e metodi

Abbiamo studiato 22 pazienti con porpora trombocitopenica idiopatica (PTI), 34 pazienti con trombocitopenia indotta da chemioterapia per neoplasie epiteliali / ematologiche o ipo-aplasie midollari, e 20 soggetti normali di controllo, paragonabili per sesso ed eta'. La determinazione delle piastrine reticolate e' stata effettuata in citofluorimetria (FACS Calibur, Becton Dickinson), colorando le piastrine, separate dal sangue periferico anticoagulato con EDTA e risospese nel plasma, con Arancio di Tiazolo (Retic-Count, Becton Dickinson).

Risultati

I soggetti con PTI presentavano una percentuale di piastrine reticolate significamente piu' alta (16,4 ± 9 %; P <0,01), sia rispetto ai pazienti con piastrinopenia da ridotta produzione midollare (4,9 ± 2,7 %) che nei confronti dei soggetti normali (6,8 ± 2,4 %), mentre nessuna differenza statisticamente significativa era dimostrabile tra i pazienti con piastrinopenia da ridotta produzione midollare e soggetti di controllo. Anche il canale medio di fluorescenza era significatamente piu' alto (P< 0.001) nei pazienti con PTI (media 308, intervallo 278-340) rispetto ai soggetti con piastrinopenie iporigenerative (media 241, intervalo 216-280) e ai soggetti normali (media 263, intervallo 250-283).

Discussioni e conclusioni

Questi risultati consentono di affermare che la misurazione delle piastrine reticolate e' di grande utilita' nella diagnosi differenziale tra le trombocitopenie iperdistruttive e quelle ipoplastiche.

Kurata et al
Am J Clinic Pathol, 115,656,2001
Taba K et al
Rinsho Ketsuaki 41,1151,2000

C-03

LIVELLI SIERICI DI TROMBOPOIETINA NELLE TROMBOCITOPENIE E NELLE TROMBOCITOSI REATTIVE E CLONALI.

G. LOBREGLIO, A. VALACCA*, R. TORSELLO, T. LECCE, L. LEOPARDI, P. PENSA
Dipartimento di Patologia Clinica, *Dipartimento di Medicina, Azienda Ospedaliera "V. Fazzi", Lecce

Scopo del lavoro

La trombopoietina (TPO) e' uno dei piu' importanti fattori di regolazione della proliferazione e della maturazione dei megacariociti e della produzione delle piastine in condizioni normali e patologiche. Questo studio si propone di valutare se la misurazione dei livelli sierici di TPO possa fornire informazioni diagnostiche utili nell'analisi di pazienti affetti da diverse forme di trombocitopenie e di pazienti con trombocitosi reattiva e clonale.

Materiali e metodi

Sono stati studiati 31 pazienti (gruppo I) con trombocitopenie da ridotta produzione di piastrine (19 con mielosoppressione post-chemioterapica, 8 con sindrome mielo-displastica, 4 con anemia aplastica); 38 pazienti (gruppo II) con piastrinopenia da distruzione periferica (32 con PTI, 6 con porpora da farmaci); 13 pazienti (gruppo III) con trombocitosi clonale (4 con disordini mieloproliferativi indefiniti, 9 con trombocitemia essenziale); 16 pazienti (gruppo IV) con trombocitosi reattiva (9 con anemia da deficienza di ferro, 7 con malattie infiammatorie croniche), e 21 soggetti di controllo paragonabili per sesso ed eta' ai pazienti dei vari gruppi di patologie. Il dosaggio della TPO e' stato eseguito in doppio sul siero dei pazienti e dei controlli con metodica immunoenzimatica a sandwich su micropiastra (Quantikine-TPO, R&D systems, MN, USA).

Risultati

I risultati sono indicati in tabella

	Eta'	M/F	PIASTRINE(10^9/L)	TPO(pg/ml)
Controlli	44±29	10/11	234±77	41±16
Gruppo I	55±15	19/12	31±29	1579±491
Gruppo II	36±23	17/21	28±19	53±22
Gruppo III	60±13	6/7	1009±232	609±360
Gruppo IV	51±18	5/11	733±219	397±245

Discussione e conclusioni

I livelli di TPO nei pazienti con ridotta produzione midollare delle piastrine erano significamente piu' elevati (P<0,001) sia rispetto ai soggetti normali che ai pazienti con piastrinopenie iperdistruttive; anche nei gruppi delle trombocitosi i livelli di TPO erano significamente piu' alti (P<0,01) rispetto ai controlli, senza alcuna differenza significativa, tuttavia, tra le trombocitosi clonali e le forme reattive. I risultati indicano che nelle piastinopenie il principale determinante dei livelli di TPO appare essere la massa megacariocitaria midollare piuttosto che il numero delle piastrine, e che, nelle trombocitosi, la clearance della TPO da parte di piastrine e megacariociti non sembra essere l' unico meccanismo di regolazione delle TPO. La misurazione dei livelli sierici di TPO, pertanto, puo' essere utile per la valutazione della patofisiologia dei disordini quantitativi delle piastrine.

C-04

INUSUALE DIAGNOSI DI LEUCEMIA LINFATICA CRONICA: CASO CLINICO

P. Doretto[a] , P. Bulian[a] , A. Ermacora[b] , G. Paladini[b] , P. Cappelletti[a]

[a]Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera, Pordenone;
[b]Medicina II, Ospedale Maggiore, Trieste

Premessa e scopo del lavoro

La leucemia linfatica cronica (LLC) è una malattia che interessa tipicamente pazienti di età superiore ai 50 anni ed è del tutto inusuale in individui sotto i 30 anni di età[1]. Scopo del nostro lavoro è la descrizione di un caso di B-LLC esordito in età giovanile.

Materiali e metodi

Una donna di 28 anni nel luglio 2002 è pervenuta alla nostra osservazione in seguito all'insorgenza di sintomi sistemici (febbricola, dolori osteo-articolari) e comparsa di piccole linfoadenopatie inguinali dolenti. All'anamnesi unico dato significativo il riscontro, ad un emocromo eseguito due anni prima in corso di check-up routinario, di una linfocitosi assoluta (linfociti: 5200/μL, WBC: 10150/μL) non ulteriormente indagata. L'esame obiettivo mostrava linfoadenopatie di 1-1,5 cm di diametro in tutte le usuali stazioni di repere, polo inferiore della milza apprezzabile in inspiro, margine epatico non apprezzabile. L'esame emocromocitometrico mostrava una leucocitosi (WBC: 24200/μL) con linfocitosi marcata (linfociti: 18800/μL, 77.4%), nella norma emoglobina (13,7 g/dL) e piastrine (208000/μL). Negativi risultavano i comuni parametri biochimici, gli indici di flogosi ed i marcatori virali (HCV, HIV, EBV e HBV). L'osservazione dello striscio di sangue periferico mostrava un quadro monomorfo di piccoli linfociti con nucleo rotondeggiante, talora irregolare, cromatina molto densa, scarso citoplasma, quasi invisibile e la presenza di numerosi nuclei disgregati (ombre di Gumprecht). La tipizzazione linfocitaria mostrava un quadro classico di B-LLC: il 90% della popolazione linfocitaria costituito da linfociti B (CD19) che esprimono CD5, CD23, CD20 dim, FMC7, immunoglobuline di superficie a bassa densità IgM ed IgD con restrizione clonale K. La diagnosi è stata confermata dall'aspirato midollare e dalla biopsia ossea.

Discussione e conclusioni

Per quanta la LLC sia una malattia pressoché esclusiva dell'adulto anziano, va valutata la possibilità che una modesta linfocitosi in un paziente giovane possa rappresentare l'esordio di una LLC. In questi casi una diagnosi precoce è importante perché l'evoluzione clinica è variabile, il criterio prognostico più importante sembra essere la linfocitosi midollare ed è possibile il ricorso a terapie più aggressive quali il trapianto allogenico di cellule staminali con l'obiettivo di eradicare la malattia[2].

Bibliografia

1.O'Brien S, del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leucemia. *Blood* 1995;85:307-318
2. Dreger P, Montserrat E. Autologus and allogenic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16(6):985-92.

C-05

INTERVALLI DI RIFERIMENTO PEDIATRICI PER L'ESAME EMOCROMOCITOMETRICO CALCOLATI CON METODO INDIRETTO

Davide Giavarina, Mariarosa Carta, Giuliano Soffiati.

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

Premesse e scopo del lavoro

Il calcolo degli intervalli di riferimento per soggetti in età pediatrica è spesso ostacolato dalla difficoltà a trovare volontari per la popolazione di riferimento. Per parametri molto variabili con l'età, ove sono necessarie molte classi, l'operazione può essere ardua. Per i dati dell'emocromo, i riferimenti disponibili, di fatto, calcolano gli intervalli su popolazioni ospedalizzate. Scopo di questo lavoro è di calcolare questi intervalli con un metodo indiretto (oggettivi), su un'ampia popolazione.

Materiali e metodi

Sono stati utilizzati i dati archiviati nel LIS del Laboratorio dell'Ospedale San Bortolo, per un periodo di due anni, relativamente ai soggetti d'età inferiore a 12 anni, pervenuti all'osservazione sia come utenti esterni sia come ricoverati di tutti i reparti. I dati sono stati ottenuti con apposite query sul database replicato (Oracle).
L'analisi statistica è stata fatta secondo il metodo di Kairisto (Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1995;222:37-41).
Sono presentati qui i risultati relativi ad emoglobinemia, globuli rossi, ematocrito, MCV, MCH, MCHC, Piastrine, Leucociti. Gli emocromi sono stati eseguiti su contaglobuli SE-9000 (Sysmex, Cobe, Japan), in modalità automatica.

Risultati

La numerosità disponibile per classe è stata: 0-15g: 1.419; 16-30g: 428; 1-3m: 1.051; 4-12m:1.485; 13-24m: 2.070; 25-60m: 1.919; 61-144m: 2.546.

	HB g/dL	RBC x10^12/L	HCT L/L	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLT x10^9/L	WBC x10^9/L
0-15G	*9,6 - 22,0*	*3,03 - 6,07*	*31,0 - 63,0*	*94 - 118*	*32,0 - 40,0*	*31,8 - 36,3*	*102 - 428*	*4,7 - 19,1*
16-30G	*9 - 16,4*	*2,57 - 5,04*	*25,0 - 50,0*	*92 - 109*	*30,0 - 38,0*	*31,8 - 36,3*	*240 - 588*	*5.0 - 18,3*
1-3M	*8,0 - 14,9*	*2,36 - 4,58*	*23,0 - 44,0*	*79 - 107*	*26,0 - 35,0*	*30,8 - 35,1*	*220 - 730*	*5,4 - 15,1*
4-12M	*9,4 - 13,6*	*3,85 - 5,30*	*28,0 - 41,0*	*72 - 85*	*23,0 - 29,0*	*30,8 - 35,1*	*200 - 615*	*4,8 - 15,9*
13-24M	*10,2 - 13,8*	*4,01 - 5,34*	*32,0 - 42,0*	*72- 85*	*23,0 - 29,0*	*30,7 - 34,5*	*110 - 520*	*4,5 - 13,5*
25-60M	*10,7 - 14,4*	*4,07 - 5,43*	*33,0 - 43,0*	*73 - 87*	*24,0 - 29,0*	*31,6 - 34,3*	*180 - 490*	*4.0 - 11,5*
61-144M	*11,5 - 14,9*	*4,30 - 5,55*	*35,0 - 45,0*	*76 - 89*	*25,0 - 29,0*	*31,7 - 34,5*	*180 - 420*	*3,5 - 11.0*

Discussione e Conclusioni

Ottenere valori di riferimento in età pediatrica per via diretta è spesso operazione impossibile. La disponibilità di letteratura scientifica, relativamente all'esame emocromocitometrico, è limitata. Il "Pediatric Reference Ranges, Eds. Soldin S, Brugnara C et. al" 3ª edizione 1999, che costituisce forse la fonte più autorevole, riporta intervalli di riferimento ottenuti su popolazione non selezionata, sia "esterna" che ospedalizzata, per tre strumentazioni diverse. La numerosità delle popolazioni, specie per le età più piccole, non supera mai le poche decine o qualche centinaio di soggetti.
L'utilizzo di metodi indiretti per il calcolo dei limiti di riferimento può essere una valida scelta dovendo utilizzare popolazioni di riferimento non selezionate. In questo caso la numerosità del campione è però necessaria per superare l'ostacolo della mancata "selezione a priori". I nostri dati sono ottenuti da popolazioni di dimensioni circa 10 volte superiori a quelle oggi disponibili in letteratura. Inoltre, essi si riferiscono a una strumentazione (Sysmex) per la quale non si hanno riferimenti bibliografici.
La diffusione di Sistemi Informativi di Laboratorio (LIS) sempre più flessibili e "*user frendly*" può oggi consentire di possedere basi di dati opportune per un corretto calcolo degli intervalli di riferimento con metodi indiretti.

C-06

INTERVALLI DI RIFERIMENTO DEI PARAMETRI RETICOLOCITARI IN NEONATI SANI NEL PERIODO COMPRESO TRA LA 34ª E LA 41ª SETTIMANA DI GRAVIDANZA.

M. Maconi[a], B. Casolari[b] , M.Collell[a] , I. Gardini[a] , O. David[a] , A.M. Cenci[b].

[a]Laboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera O.I.R.M.-S.Anna,Torino; [b]Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale S. Agostino, Modena

Scopo del lavoro

La conta dei reticolociti è un test estremamente utile per il monitoraggio dell'attività eritropoietinica del midollo osseo. Nei neonati questa funzione risulta diversa rispetto a quella dei soggetti di differenti fasce dell'età pediatrica e dell'età adulta. Diventa, quindi, importante stabilire gli intervalli di riferimento per i neonati, poiché da una corretta definizione di questi dipende il riconoscimento di anomalie dei parametri ematologici.
Scopo del presente lavoro è stato quello di individuare i valori di riferimento dei parametri reticolocitari su sangue cordonale nel periodo compreso tra la 34ª e la 41ª settimana.

Materiali e Metodi

Sono stati analizzati 95 campioni di sangue cordonale provenienti da neonati sani in un'epoca compresa tra la 34ª e la 41ª settimana di gestazione. La popolazione studiata è stata suddivisa in base alla maturità fetale in 4 gruppi. Sui campioni, raccolti in K_3EDTA, è stata eseguita una doppia analisi utilizzando l'analizzatore ematologico ADVIA120 (Technicon-Bayer). Nella valutazione finale, sono state considerate le medie delle due determinazioni. I parametri reticolocitari presi in considerazione sono i seguenti: valore assoluto dei reticolociti (# Ret), valore percentuale dei reticolociti (%Ret), contenuto emoglobinico reticolocitario (Chr), valore percentuale dei reticolociti ad alto assorbimento (%H-Ret), valore percentuale dei reticolociti ad assorbimento medio (%M-Ret) e valore percentuale dei reticolociti a basso assorbimento (%L-Ret).

Risultati

I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella:

	TOTALE (N=95)		< 39 SETT (N=19)		39 SETT (N= 30)		40 SETT (N=34)		>40 SETT (N=12)	
	Media	Range	Media	Range	Media	Range	Media	Range	Media	Range
#Ret x 10^9/L	163,5	93,3 - 233,7	164,1	68,9 – 259,3	166,3	112,1 - 220	162	86,4 - 237,6	159,7	109 -210,7
%Ret %	3,55	1,95 - 5,35	3,87	2,09 - 5,75	3,50	2,20 - 4,78	3,45	1,65 - 5,25	3,5	2,4 - 4,6
Chr pg	34,1	30,7 - 37,5	35,1	33,0 - 37,2	33,9	30,7 - 37,1	33,9	29,9 - 37,9	33,6	31,4 - 35,8
% H-Ret%	27,4	12,0 - 42,8	30,8	14,0 - 47,6	24,8	11,0 - 38,6	28,2	13,2 - 43,2	27,0	12,4 - 41,6
% M-Ret%	21,0	15,6 - 26,4	21,7	14,1 - 29,3	21,0	16,6 - 25,4	20,6	15,6 - 25,6	21,1	17,1 - 25,1
% L-Ret%	51,5	36,1 - 66,9	47,5	29,9 - 65,1	54,2	41,4 - 67,0	51,2	35,6 - 66,8	51,8	38,6 - 65,0

Discussione e Conclusioni

I risultati ottenuti mettono in evidenza le variazioni che i parametri reticolocitari presentano nelle diverse settimane di gravidanza. Quelle più significative si notano fra il gruppo dei neonati di età inferiore alla 39ª settimana e il gruppo della 39ª settimana. Tra questi due gruppi, la differenza risulta statisticamente significativa nella frazione H-Ret e L-Ret ($p<0.01$). Infatti, mentre la H-Ret diminuisce nella 39ª settimana, nello stesso periodo la frazione L-Ret mostra un aumento. Questi risultati, pur preliminari, indicano come sia necessaria, anche per questi intervalli di riferimento, una definizione dettagliata per fasce di età gestazionale, al fine di favorire il corretto utilizzo e l'efficacia clinica nel contributo al riconoscimento di anomalie ematologiche nei neonati.

C-07

STUDIO DEI PARAMETRI EMATOLOGICI NEL SANGUE CORDONALE DI NEONATI SANI A TERMINE : CONFRONTO DI DUE DIFFERENTI FILOSOFIE ANALITICHE

M. Maconi[a], B. Casolari[b], M. Collell[a], I. Gardini[a], A.M. Cenci[b].

[a]Laboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera O.I.R.M.-S.Anna, Torino; [b]Laboratorio Patologia Clinica, Ospedale S. Agostino, Modena

Scopo del lavoro

Negli ultimi anni è notevolmente cresciuto l'interesse per la composizione e la qualità del sangue cordonale. Le motivazioni principali allo studio di questo materiale riguardano, da un lato il tentativo di arricchire le attuali conoscenze diagnostiche e prognostiche per le patologie presenti sui due versanti madre/feto; dall'altra la possibilità di riconoscere elementi quali le cellule staminali circolanti, presenti in questo materiale in genere in più alta concentrazione, per sfruttarne l'utilizzo a fini trapiantologici e trasfusionali, ormai in un numero sempre crescente di casi. L'esame emocromocitometrico, oggi anche arricchito con nuovi parametri, fornisce molte di queste notizie e sono presenti in letteratura numerosi lavori sull'utilizzo degli emocitometri nello studio della popolazione neonatale.
Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare e correlare i risultati ottenuti su campioni di sangue cordonale esaminati con due sistemi per ematologia comunemente presenti nell'attività dei laboratori routinari e a filosofia analitica differente.

Materiali e Metodi

Sono stati analizzati 83 campioni di sangue cordonale provenienti da neonati sani a termine di gravidanza. I campioni per emocromo sono stati raccolti in K_3 EDTA .
Gli emocromi sono stati eseguiti con il contaglobuli Sysmex SE-9500 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) e con ADVIA120 (Technicon, Bayer). Per ogni campione, è stata effettuata una doppia analisi con ogni analizzatore e, ai fini della valutazione, sono state considerate le medie delle due determinazioni. Per la elaborazione statistica, è stata applicata la regressione lineare e calcolato il coefficiente di correlazione; è stato considerato significativo un valore di $p<0.05$.

Risultati

I risultati ottenuti sono mostrati in tabella :

	SYSMEX SE-9500		ADVIA120			
	MEDIANA	RANGE	MEDIANA	RANGE	r	p
WBC x 10^3/µL	13,7	4,5 - 22,9	15,2	5,4 - 24,8	0,98	< 0.001
RBC x 10^6/µL	4,6	3,4 - 5,8	4,6	3,3 - 5,9	0,96	< 0.001
HGB g/dL	16,4	12,0 - 20,8	16,4	12,0 - 20,8	0,98	< 0.001
HCT %	49,9	36,7 - 63,1	50,2	35,6 - 64,8	0,96	< 0.001
RDW %	17,4	14,7 - 20,1	16,4	12,2 - 20,6	0,43	< 0.001
MCV fL	109	100 - 118	110	99 - 121	0,77	< 0.001
MCH pg	35,8	32,4 - 39,2	35,6	32,0 - 39,2	0,76	< 0.001
MCHC g/dL	32,9	31,3 - 34,5	32,6	31,6 - 33,6	0,05	NS
PLT x 10^3/µL	293	145 - 441	277	135 - 419	0,86	< 0.001
MPV fL	10,4	8,7 - 12,1	8,4	7,0 -9,8	0,82	< 0.001

Discussione e Conclusioni

Le mediane e i ranges ottenuti concordano, per entrambi gli strumenti, con i valori presenti in letteratura e provenienti da altri studi simili. I ranges di valori osservati con le due strumentazioni risultano sovrapponibili. L'unico parametro che non mostra una correlazione significativa è l'MCHC. Più interessante sembra, a questo proposito, il parametro CHCM fornito da ADVIA. Questo, infatti, essendo un dato misurato e non calcolato, può aggiungere una informazione di notevole interesse nella definizione della qualità delle emazie neonatali. Analizzando, poi, i risultati per dati appaiati, si evidenziano alcune differenze fra i due analizzatori. In particolare, il contaglobuli SE-9500 rivela una sottostima di entità significativa ($p<0.001$) nelle determinazioni di WBC, HGB, RBC e HCT e una tendenza ad una sovrastima, anch'essa significativa ($p<0.001$), dell'RDW.

C-08

IL LABORATORIO DI EMATOLOGIA: PROTOCOLLO DIAGNOSTICO NELLE SINDROMI MIELODISPLASTICHE.

[a]PAPARO C., [b]CAMETTI G.

[a]Laboratorio Analisi, [b]Medicina Interna, Ospedale Maggiore Chieri (To).
Gruppo Piemontese per lo studio delle Sindromi Mielodisplastiche.

Nel 1998 si è costituito in Piemonte un gruppo di studio per le Mielodisplasie con lo scopo di formalizzare un protocollo diagnostico e terapeutico e dei programmi di studio per queste patologie. Al gruppo aderiscono su base volontaria tutte le U.O. di Ematologia e le Medicine della Regione che si occupano di questi pazienti.
Tutti i partecipanti adottano lo stesso protocollo diagnostico e tutti i dati afferiscono ad un Registro Regionale (sito Web: www.mds.piemonte.it).

Vengono presi in esame *l'aspetto epidemiologico*, *l'inquadramento diagnostico* e il *trattamento terapeutico.*

Per **l'aspetto epidemiologico** sono valutati specificatamente: i dati anamnestici (sesso, età, data diagnosi, residenza), l'attività lavorativa svolta, eventuale patologia neoplastica precedente o concomitante, presenza di comorbidità, eventuali fattori di rischio farmacologico (terapia immunosoppressiva, citostatica, radiante, assunzione di psicofarmaci e di biguanidi), esposizione a fattori di rischio lavorativo (benzene e derivati come solventi, vernici; lavorazione della gomma, petrolio e derivati come gasolio e benzina; prodotti vinilici come plastica e colle; insetticidi, pesticidi, diserbanti; fumi di saldatura; radiazioni ionizzanti), a fumo di sigaretta, uso di tinture per capelli, esposizione a campi magnetici.

Esami diagnostici o di studio effettuati: agoaspirato e biopsia osteomidollare, cariotipo, ricerca di eventuali marcatori molecolari specifici (quali il gene tumore di Wilms WT1) in biologia molecolare e congelamento delle cellule per ulteriori studi, indagine citofluorimetrica su sangue midollare con specifico protocollo analitico, valutazione dei cloni EPN+ su sangue periferico, studio sull'autoimmunità.

Terapie adottate: terapie citostatiche e differenziative; trapianto allogenico; terapia immunosoppressiva con impiego di siero antilinfocitario e ciclosporina; terapia sperimentale con talidomide.
Tutte le proposte terapeutiche prevedono dei criteri di inclusione e di esclusione, una valutazione della risposta a 3-6-9-12 mesi dall'inizio della terapia.
In particolare vengono analizzati il tipo e la durata della risposta, gli eventi avversi, il fabbisogno trasfusionale, tipo e gravità di infezioni intercorrenti, la sopravvivenza globale, la sopravvivenza con malattia asintomatica, la Qualità di vita.

Per ogni paziente viene compilata una scheda riassuntiva comprensiva dei dati epidemiologici, degli esami diagnostici effettuati, della diagnosi finale, dello International Prognostic Score (IPSS) che tiene conto della blastosi midollare, del cariotipo e della citopenia o lo Spanish Score nel caso non fosse disponibile il cariotipo (che tiene conto della quota di blasti midollari, del numero delle piastrine e dell'età), e della terapia effettuata.
L'obiettivo ricercato è che i nuovi studi biologici e i nuovi approcci farmacologici forniscano delle reali ed efficaci opportunità terapeutiche ad un numero sempre crescente di pazienti.

C-09

CONTA PIASTRINICA OTTICA, IMPEDENZIOMETRICA E IMMUNOFLUORIMETRICA: CONFRONTO TRA DIVERSE METODOLOGIE

PAPARO C., FIERRO G., LEMBO M., NICELLI A., VETTORETTO M.
Laboratorio Analisi, Ospedale Maggiore Chieri (To).

Scopo del lavoro: valutazione del conteggio piastrinico in immunofluorescenza rispetto alle metodiche tradizionali.
Il conteggio piastrinico viene principalmente utilizzato in clinica per il monitoraggio dei pazienti in terapia mieloablativa, per identificare i soggetti piastrinopenici e nello screening delle trombofilie.
Fin dai primi anni '60 è stato dimostrato che esiste una correlazione quantitativa tra episodi emorragici e conta piastrinica (1) e che gli episodi di sanguinamento diminuiscono nei pazienti trasfusi a scopo profilattico(2). Nel 1986 US National Institutes of Health Consensus Development Conference on Platelet Transfusion Therapy ha stabilito il conteggio di **$20x10^3/\mu L$** come soglia trasfusionale in presenza di sanguinamento importante, **$5x10^3/\mu L$** nel caso di pazienti in condizioni cliniche stabili .
Materiali e metodi.
Il sistema ematologico Abbott Cell-Dyn 4000 utilizza routinariamente una conta impedenziometrica (PLTi) e una conta ottica(PLTo) tramite lo scatter luminoso bidimensionale 90^0e 7^0; per conteggi $< 20x10^3/\mu L$ il conteggio PLTi viene fornito solo se esiste una differenza significativa tra le due conte.
Può inoltre eseguire una conta in immunofluorescenza (immunoPLT) con metodica completamente automatizzata utilizzando una provetta contenente un anticorpo monoclonale liofilizzato marcato con isotiocianato di fluorescina, che lega il CD61 (glicoproteina GpIIIa piastrino specifica). Le piastrine vengono identificate in base alla fluorescenza verde (canale di lettura FL1) e allo scatter luminoso a 90^0 e 7^0 gradi. Il referto completo di emocromo e conta immunologica è fornito in circa 6 minuti. Il conteggio è lineare sino a $1x10^3/\mu L$.
L'accuratezza e la precisione della conta automatizzata tradizionale sono influenzati soprattutto dai bassi conteggi e dalla capacità di differenziare le piastrine da altri elementi cellulari e dai rumori di fondo.
Per valutare la conta immunoPLT abbiamo analizzato 50 campioni di pazienti piastrinopenici e abbiamo correlato le tre metodiche. Sono stati valutati gli istogrammi dei relativi conteggi e sono stati osservati gli strisci di sangue al microscopio di tutti i campioni per escludere artefatti come gli aggregati o il satellitismo piastrinico.
I risultati sono espressi in tabella.

Campioni: 50	PLTo x $10^3/\mu L$	PLTi x $10^3/\mu L$	immunoPLT x $10^3/\mu L$
valore medio	29.8	39.0	32.3
valore minimo	0.58	20.1	3.4
valore massimo	84.3	81.9	94.2
Correlazione	PLTo vs PLTi	ImmunoPLT vs PLTo	ImmunoPLT vs PLTi
r	0.73	0.87	0.87

Discussione e Conclusioni.
La correlazione tra PLTo e PLTi è ridotta nelle piastrinopenie, la metodica immunoPLT correla meglio con entrambe. Nel nostro lavoro la conta ottica è sottostimata (-8%) e la conta impedenziometrica è sovrastimata (+21%) rispetto alla conta in immunofluorescenza.
In effetti nei bassi conteggi aumenta il numero delle piastrine giganti che per ragioni di soglia possono essere escluse nel conteggio ottico, mentre il conteggio impedenziometrico include particelle che non sono piastrine. Il conteggio immunoPLT permette un conteggio accurato e preciso anche nel caso di campioni critici limitando la trasfusione piastrinica nei casi effettivamente necessari.
Referenze
1. Gaydos LA, N.Eng J. Med. 1962; 266: 905-909.
2. Higby DJ Transfusion 1974; 14: 440-446

C-10

Il recettore solubile della transferrina (sTfR) nel neonato a termine e nel pretermine. Nostra esperienza.

O. Radillo, °V. Forleo, E. Ciacchi, P. Rosa, °P. Petaros, R. Simeone, S. Parco

U.O. Laboratorio ricerche cliniche; °U.O. Terapia intensiva neonatale. IRCCS Burlo Garofolo, Trieste.

Scopo del lavoro

Il recettore solubile della transferrina (sTfR) è una glicoproteina di membrana di 190kd, formata da due identiche subunità legate tra loro da un ponte disolfuro. Ciascuna di queste può captare il ferro veicolato dalla transferrina e trasportarlo all'interno della cellula. Le più alte concentrazioni del sTfR si trovano sul sinciziotrofoblasto dei villi placentari e sulle cellule eritroidi midollari. La forma solubile e circolante del recettore della transferrina prodotta dalla proteolisi è presente nel plasma legata alla transferrina e riflette il fabbisogno di ferro dei precursori delle cellule eritroidi prima che compaiano altri marker di deficit e non varia con la fase acuta della flogosi. Scopo del presente studio, in presenza di una letteratura contradditoria, è quello di valutare il suo possibile significato in due gruppi di neonati, a termine e a pretermine.

Materiali e metodi

A tal fine sono stati studiati 60 neonati, con peso medio alla nascita di g 2.127 (max 3.490, min 600), di età gestazionale media di 36 settimane (max 42, min 24), sui quali sono stati determinati nel sangue periferico il sTfR, l'esame emocromocitometrico e la ferritina. Il sTfR è stato dosato con metodo immunoturbidimetrico (COBAS® INTEGRA); l'esame emocromocitometrico è stato effettuato con l'analizzatore DASIT XE 2100.

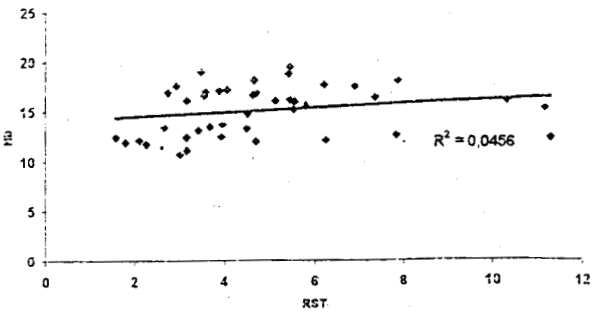
Risultati

I risultati ottenuti indicano che il sTfR non correla in modo statisticamente significativo con l'Hb (fig.1), l'MCV, l'RDW, l'HDW e la ferritina; non c'è correlazione con l'età gestazionale (fig.2) ed il peso alla nascita. I nostri dati indicano inoltre che alla 35ª settimana di età gestazionale il valore del sTfR é maggiore che quello delle settimane seguenti.

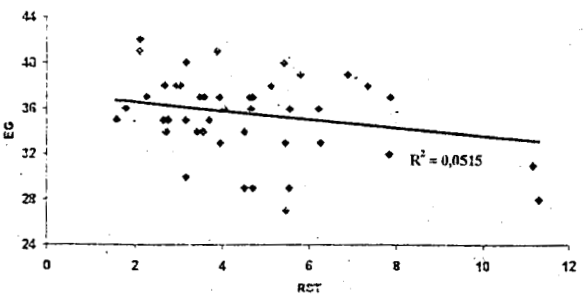
Discussione e conclusioni

Attualmente il sTfR non rappresenta un parametro da utilizzare correntemente per la diagnosi precoce di anemia sideropenica in neonatologia. Diversamente che nell'età adulta la concentrazione di sTfR non correla significativamente con le concentrazioni del ferro ematico del soggetto né con l'età gestazionale. Ulteriori studi sono necessari per valutarne le concentrazioni materne e il metabolismo materno-fetale in relazione al patrimonio di ferro.

Relazione tra Hb e recettore solubile transferrina (RST)
Figura 1



Relazione tra età gestazionale (EG) e recettore solubile transferrina (RST)
Figura 2



C-11

DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI EMOCROMOCITOMETRICI IN PRESENZA DI CRIOAGGLUTININE: PERFORMANCE DEGLI ANALIZZATORI CELL-DYN-ABBOTT

A. Vagni, E. Mainardi, A. Bruschi, S. Carenzi, A. Grassini, A. Montanelli

Dipartimento di Patologia clinica , Laboratorio Analisi, A.O. "Ospedale Maggiore di Crema"

Scopo del lavoro

A seguito del verificarsi di casi con vistosa disparità di conteggio dei leucociti, delle emazie e della determinazione dell'Hb tra campioni dello stesso paziente processati in regime di urgenza e in regime di routine, rispettivamente sugli analizzatori 3200 e 4000 della serie Cell-Dyn della Ditta Abbott, abbiamo sottoposto ad esame le performance analitiche della strumentazione in uso.

Materiali e metodi

Strumento Cell-Dyn 3200

Principi di funzionamento : citometria a flusso con focalizzazione idrodinamica e metodo di lettura ottica (sorgente luminosa : laser). Rilevazione della luce deviata per le popolazioni leucocitarie: 0° (dimensioni) ,7° (complessità), 90° (lobularità), 90° depolarizzata (granularità). Globuli rossi e piastrine rilevati su canale ottico, emoglobina rilevata con determinazione colorimetrica. Il campione di sangue viene distribuito, attraverso una valvola di ripartizione, in 3 diverse camere di miscelazione dedicate rispettivamente ai globuli bianchi, ai rossi e piastrine, all'emoglobina.

Strumento Cell Dyn 4000

I principi di funzionamento sono gli stessi del Cell-Dyn 3200 fatta eccezione per le seguenti caratteristiche: assenza di valvola di ripartizione sostituita da sistema di campionamento con dispensazione aliquotata per ogni singolo parametro; globuli rossi e piastrine conteggiati con metodo ottico ed impedenziometrico; il sistema è inoltre dotato di una unità di preriscaldamento che porta i reattivi per la diluizione dei globuli bianchi alla temperatura di 40°C.

Risultati

	Cell-Dyn 3200	**Cell-Dyn 4000**
Globuli bianchi	222.000/µl	4.640/µl
Globuli rossi	3.180.000/µl	3.360.000/µl
Emoglobina	8.85 g/dl	11 g/dl
PLT	210.000 /µl	224.000/µl
Neutrofili	15.2 %	47.7 %
Eosinofili	0.4 %	2.1 %
Basofili	16.3 %	0.26 %
Linfociti	42.1 %	40.7 %
Monoliti	25.9 %	9.18 %

L'esame citomorfologico ed il conteggio della formula leucocitaria effettuati al microscopio ottico sono risultati sovrapponibili ai dati forniti dal Cell-Dyn 4000; sono stati evidenziati numerosi rouleaux eritrocitari con impilamento stretto delle emazie. La successiva ricerca di crioagglutinine ha fornito esito positivo.

Discussione e conclusioni

La termostatazione a 40°C dei reagenti per la conta dei globuli bianchi consente allo strumento Cell-Dyn 4000 di effettuare un corretto conteggio delle cellule anche in presenza di crioagglutinine; di difficile spiegazione rimane la sottostima da parte del Cell-Dyn 3200 dell'emoglobina (ipotesi: ingombro meccanico da parte dei globuli rossi agglutinati nella valvola di ripartizione del campione).

C-12

CISTATINA E RENE DA MIELOMA : dati preliminari di uno studio clinico

M. Ruggeri[(a)], M.Persiani[(b)]

(a) Medicina di Laboratorio 1, Azienda Ospedaliera San Giovanni- Addolorata, Roma
(b) Reparto di Ematologia, Azienda Ospedaliera San Giovanni-Addolorata,Roma

Scopo del lavoro

Uso della cistatina C come marker sensibile di filtrazione glomerulare in pazienti affetti da Mieloma Multiplo (MM) con e senza insufficienza renale (IR) e da Gammapatia monoclonale di incerto significato (MGUS) a confronto con i dati della creatinina e della $\beta_2$microglobulina.

Materiali e metodi

Abbiamo determinato la Cistatina C in 44 pazienti affetti da mieloma multiplo e da gammapatie monoclonali così suddivisi:

	Creatinina	*Cistatina C*	*$\beta_2$microglobulina*
M.M.senza I.R.	<2mg/dL	1.6 mg/L (0.86-2.60)	3.62 mg/L (1.43-6.20)
M.M. con I.R.	>2mg/dL	2.35 mg/L (1.79-4.29)	4.75 mg/L (1.78-10.30)
MGUS	< 2 mg/dL	1.04 mg/L (0.32-1.91)	2.41 mg/L (1.8-2.42)

La metodica usata è la PENIA(particle enhanced nephelometric immuno assay) della Dade-Berhing che si basa sul dosaggio immunologico di anticorpi specifici di coniglio anti cistatina C umana legati covalentemente a particelle di clorometilstirene.

Risultati

Abbiamo notato nei pazienti con M.M. nelle varie fasi della malattia, stadio III e sottoposti a cicli di chemioterapia, valori di cistatina C elevati nel gruppo di pazienti senza insufficienza renale e sensibilmente elevati in quello con insufficienza renale media. I valori di cistatina C correlano con i valori di creatinina.

Nei pazienti con MGUS in genere c'è correlazione tra cistatina C e creatinina: in alcuni casi la cistatina C è elevata e la creatinina è nella norma.

Discussione e Conclusioni

La creatinina è specifica ma poco sensibile nello svelare lievi alterazioni del filtrato glomerulare. E' stata notata una lieve alterazione intraindividuale dei valori di cistatina C: ciò probabilmente in rapporto ad un riconoscimento precoce di ridotta massa renale funzionante e quindi ad una maggiore sensibilità nello svelare piccole variazioni del filtrato glomerulare (GFR)

Per concludere:

- cistatina C e creatinina sono sovrapponibili nel mettere in evidenza importanti variazioni di GFR
-la cistatina C sarebbe più sensibile della creatinina,consentendo di misurare piccole variazioni di GFR in un ambito di valori vicini alla normalità.
-i valori di cistatina sembrano non essere influenzati dalla massa neoplastica contrariamente a quelli della $\beta_2$microglobulina.
-la cistatina è indipendente da processi infiammatori,infettivi e disturbi nutrizionali

C-13

SU DI UN CASO DI OMOZIGOSI PER HBE IN GRAVIDANZA.

A. Giacomini[a], L. Bergamini[b], P. Legovini[a], S. Valverde[a], F. Antico[a], M.M. Salvadego[a], F. Manoni[a], R. Sartori[b], G. Gessoni[a].

[a]Dipartimento di Patologia Clinica, P.O. Chioggia (VE).[b]U.O. Ostetricia e Ginecologia, P.O. Chioggia (VE)

Introduzione

L'emoglobina E è una variante della catena beta ($\alpha 2\beta 2^{26Glu\text{-}Ly}$) comune nel Sud-Est Asiatico la maggiore prevalenza di portatori è registrata in alcune regioni della Tailandia, della Cambogia e del Laos. La mutazione comporta la presenza di un falso sito di clivaggio all'interno dell'esone e di conseguenza la catena βE è sintetizzata in misura ridotta rispetto alla βA. Per questa ragione gli eterozigoti ed in maggior misura gli omozigoti presentano tratti talassemici. Mentre l'omozigosi per HbE produce una sindrome clinica di lieve entità le conseguenze cliniche più gravi sono dovute alla doppia eterozigosi HbE/βtalassemia. In seguito agli attuali flussi migratori tale evenienza aumenta di frequenza anche nel nostro territorio di per sé ad elevata frequenza per la β-talassemia ed altre β-varianti.

Descrizione dell'Iter Diagnostico

La paziente P.T. di anni 34 di etnia Thai, veniva alla nostra osservazione nel maggio 2001 in 12ma settimana di gestazione per eseguire degli accertamenti diagnostici per il monitoraggio della gravidanza. In quella occasione veniva rilevata una modesta anemia (Hb 105 g/L, Ht 33%) microcitica (MCV 66.2 fL), ferritina 105 μg/L, (VN 10-160 μg/L), sideremia 28.9 μm/L (VN 8.77-27.9 μm/L). In tale occasione veniva eseguita una elettroforesi alcalina delle emoglobine che dimostrava la presenza di una emoglobina variante (migrante in zona A2) che costituiva il 98% del totale. Un approfondimento in HPLC (Tosoh, HLC-723G7, Tokyo) confermava la presenza della variante. L'identificazione positiva della variante ci è stata fornita dal Centro Microcitemie di Rovigo.

Studio familiare

Grazie alla collaborazione del Laboratorio di Patologia Clinica del Korat Memorial Hospital (Thailandia) è stato possibile ricostruire l'albero genealogico della paziente. I genitori, entrambi eterozigoti presentavano una percentuale di HbE attorno al 30%, la paziente aveva quattro tra fratelli e sorelle dei quali uno sano, due eterozigoti ed uno omozigote. Il partner della paziente presentava assetto emoglobinico normale, la gravidanza si concludeva in 40ma settimana con un parto operatorio e nascita di un bambino eterozigote clinicamente sano.

Conclusioni

Il caso presentato ci è sembrato degno di segnalazione in quanto esempio di screening prenatale per la prevenzione di una grave sindrome talassemica trasfusione dipendente di nuova comparsa nella nostra area in seguito alla formazione di una società multietnica.

C-14

VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE PIASTRINICA *IN VITRO* MEDIANTE ADVIA 120

A.Giacomini[a], P. Legovini[b], S.Valverde[a], F. Antico[a], M.M. Salvadego[a], F. Manoni[a], G. Gessoni[a]

[a]Dipartimento di Patologia Clinica, P.O. Chioggia (VE); [b]Dipartimento di Matematica Pura ed Applicata, Università di Padova

Scopo del lavoro

L'analizzatore ematologico ADVIA™ 120 (Bayer, Tarrytown, NY) fornisce un profilo piastrinico che, come suggerito dalla recente letteratura, può essere utilizzato per studiare lo stato di attivazione piastrinica sia su sangue intero che su concentrati piastrinici. Ci siamo proposti di studiare, per mezzo di questo sistema ematologico, le modificazioni indotte dall'ADP in concentrazione massimale su plasma ricco di piastrine (PRP).

Materiali e metodi

Sei campioni di PRP sono stati analizzati immediatamente dopo la preparazione (tempo zero) su ADVIA 120; poi ciascun campione è stato diviso in due aliquote, la prima delle quali è stata analizzata dopo 60 minuti di incubazione a temperatura ambiente senza attivazione (NA). La seconda aliquota è stata attivata con ADP (20 μmol/L) ed è stata incubata a temperatura ambiente. Da questa aliquota sono stati prelevati e processati campioni a intervalli di 5 minuti per i primi 15 minuti, e successivamente a intervalli 15 minuti fino a 60 minuti. Sono stati raccolti ed analizzati i dati relativi ai seguenti parametri piastrinici: conta piastrinica (PLT), volume piastrinico medio (MPV), componente piastrinica media (MPC), massa media piastrinica (MPM) e conta degli aggregati piastrinici (Clumps).

Risultati

La media e la deviazione standard dei parametri studiati sono presentati in tabella. In seguito all'attivazione mediante ADP, si assiste come previsto ad una riduzione della conta piastrinica e a un concomitante aumento degli aggregati piastrinici, anche se quest'ultimo dato è affetto da un'alta variabilità. MPC presenta un iniziale aumento seguito da una progressiva discesa, divenendo significativamente inferiore rispetto al valore basale dopo 60 minuti di attivazione. MPV ha un comportamento speculare, con un'iniziale riduzione seguita da un graduale aumento. MPM mostra un immediato e significativo aumento, per restare poi costante per tutto il periodo di incubazione. Nessuna correlazione significativa è stata dimostrata tra le variazioni di MPC e quelle degli altri parametri esaminati.

Incubazione (minuti)	PLT (10^3/μL)	MPV (fL)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (g/dL)	Clumps (10^3/μL)
0 NA	402±38	8.53±0.51	25.95±0.63	7.48±0.42	2.03±0.08	31±12
5	143±35	8.22±0.41	28.52±0.57	4.65±0.16	2.23±0.06	1838±1557
10	131±55	8.38±0.49	28.65±0.68	4.65±0.29	2.34±0.08	1085±1387
15	93±23	8.77±0.47	27.92±0.58	4.63±0.24	2.37±0.09	1066±1470
30	74±16	9.23±0.71	26.12±0.43	5.00±0.23	2.32±0.15	117±66
45	65±11	10.50±0.66	25.12±0.31	5.35±0.31	2.41±0.12	1209±1196
60	60±17	10.77±0.76	23.80±0.47	5.00±0.35	2.38±0.14	1055±1032
60 NA	365±46	8.98±0.51	24.78±0.45	7.85±0.16	2.06±0.16	27±18

Discussione e Conclusioni

La determinazione del profilo piastrinico su ADVIA 120 di campioni attivati con ADP dimostra l'utilità di MPC come indice di attivazione, qualora questo parametro sia valutato dopo un adeguato periodo di incubazione. Dal momento che tale parametro non è correlato agli altri parametri piastrinici, risulta comunque utile fornire un profilo piastrinico completo.

C-15

DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELL'ANEMIA DA DIFETTO DI MATURAZIONE: STUDIO OSSERVAZIONALE

F. Bamonti, D. Di Cataldo, C. Novembrino, O. Morabito, M. Pomati, S. Ippolito, S. Lonati, A.T. Maiolo

Dipartimento Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, U. O. Ematologia I Centro Malattie del Sangue "G. Marcora", Ospedale Maggiore-IRCCS, Milano

Scopo del lavoro

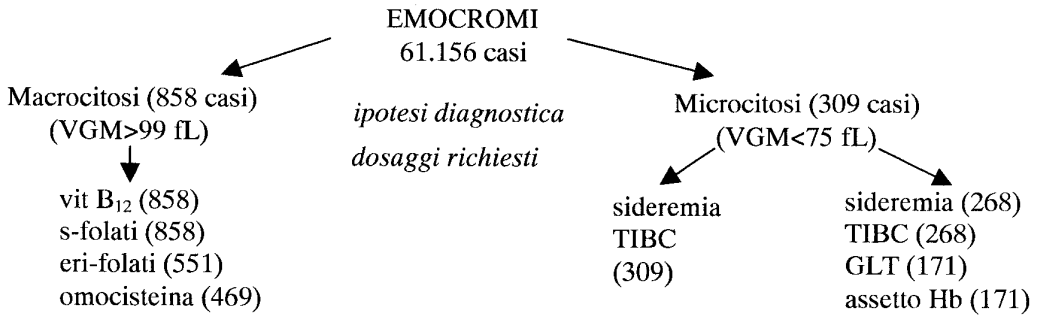
Valutare l'impegno diagnostico e l'impatto epidemiologico delle anemie da difetto di maturazione cellulare analizzando la distribuzione percentuale degli esami effettuati e di alcuni parametri (quali sesso, età, razza, concentrazione dell'analita etc) sulla popolazione afferente al laboratorio dell'U.O. di Ematologia I di un Ospedale con ampio bacino d'utenza in un periodo ben definito (1° semestre 2000).

Materiali e Metodi

Una volta effettuato l'esame emocromocitometrico, l'analisi dei singoli parametri può indirizzare il clinico verso l'ipotesi diagnostica di anemia da difetto di maturazione. Per i casi di sospetta macrocitosi (difetto a livello nucleare) e per quelli di sospetta microcitosi (difetto a livello citoplasmatico), i dosaggi ematici normalmente richiesti sono riportati in tabella assieme ai risultati.

Le metodiche utilizzate sono tests routinari e prevedono: dosaggi immunoenzimatici (vit B_{12} e folato: MEIA; Omocisteina: FPIA, Abbott) su analizzatore semiautomatico IMx (Abbott), dosaggi spettrofotometrici (sideremia e TIBC) su spettrofotometro Uvikon 940 (Kontron Instruments) ed indagine cromatografica delle frazioni emoglobiniche in HPLC (Diamat, Bio-Rad).

Risultati



Discussione e Conclusioni

La richiesta di analisi di II livello per anemia macrocitica o microcitica risultava indipendente dall'età (83% 18-65 anni) e dal sesso (53%M, 47%F e 49%M, 51%F, rispettivamente) in quanto l'insorgenza di tali anemie può essere causata da deficit alimentare e/o genetico, difficoltà di assorbimento e/o di utilizzo etc. Il dosaggio di folato eritrocitario, meno diffuso nei laboratori per il particolare trattamento del campione ematico e quindi meno noto ai medici generici, era meno richiesto rispetto a quello del folato sierico. In generale la carenza di tali vitamine era riscontrata nel 13.5% della popolazione analizzata. Il dosaggio di omocisteina, mezzo diagnostico aggiuntivo per la macrocitosi, evidenziava una condizione di iperomocisteinemia nella maggior parte dei casi esaminati (78%) ed era in parte attribuibile ad altra patologia della quale tale metabolita è noto essere un fattore di rischio indipendente. L'analisi dei dati riguardanti i dosaggi di sideremia e di TIBC mostrava che i casi di sideropenia effettivi risultavano essere il 18%, mentre quella dello screening della microcitemia riscontrava il 43.5% di casi di emoglobinopatie e talassemie. Degno di nota è il trend in ascesa (4.7% nel 1999, 7% nel 2000, 8.2% nel 2001) del numero di stranieri, per i quali era stata richiesta l'analisi delle frazioni emoglobiniche in HPLC: il flusso migratorio sta sempre più modificando la tipologia della popolazione, afferente al nostro laboratorio e portatrice di n varianti emoglobiniche rare negli italiani (HbH, HbD). Pertanto, il nostro studio osservazionale sulle analisi più semplici (emocromo) e su quelle più approfondite e specialistiche ha fotografato la diffusione dell'anemia da difetto di maturazione cellulare nel nostro territorio in un determinato periodo.

C-16

SISTEMA AUTOMATIZZATO TEST-1: CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DELLA VES

N. Vercelli, B. Montaruli, P. Napoli, S. Plateroti, A. Martini, M. Zanellato, M. Saitta, A. Sacchi.

Laboratorio Analisi, CIOV – Ospedale Evangelico Valdese – Torino

Scopo del lavoro

Il test sulla velocità di eritrosedimentazione (VES) è considerata un'analisi utile sia per la determinazione di una risposta infiammatoria di fase acuta, sia di processi cronici e per monitorare collagenopatie, malattie reumatiche. Il metodo di riferimento ICSH comporta per l'operatore un elevato rischio biologico in quanto utilizza provette aperte e risulta troppo indaginoso per l'utilizzo nella pratica clinica. Per questo motivo sono stati introdotti sul mercato alcuni sistemi automatizzati che utilizzano provette chiuse, fra questi vi è anche il sistema TEST-1 (SIRE Analytical System, Udine, Italy), analizzatore completamente automatizzato che utilizza la tecnologia della fotometria capillare per la determinazione della VES, strumento attualmente in uso presso il nostro laboratorio. Questo sistema, purtroppo, presenta alcune difficoltà nel misurare campioni stabilizzati da usare come controllo interno di qualità (CQI). E' stato riportato in letteratura come campioni conservati per 24 ore abbiano valori di VES più bassi rispetto al valore iniziale (diminuiti di circa il 10%). Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare se la diminuzione dei valori di VES (bias) misurati 24 ore dopo il tempo zero è sufficientemente stabile da consentirne l'utilizzo come CQI.

Materiali e Metodi

Abbiamo valutato: i valori di VES ottenuti in 200 campioni di sangue venoso ed analizzati con l'analizzatore TEST-1; la stabilità nel tempo mediante analisi della significatività della differenza fra le medie misurate al tempo zero e dopo 24 ore utilizzando lo strumento TEST-1; la VES ogni giorno per circa 1 mese in 2 campioni con valori di circa 15 mm/h (13-17) e 50 mm/h (47-53) misurati entro 4 ore dal prelievo, conservati per 24 ore a 4°C e misurati il giorno dopo come fossero due CQI.

Risultati

La conservazione dei campioni a 4°C per 24 ore ha causato una significativa diminuzione dei valori di VES ottenuti con il sistema TEST-1 (differenza media = 4.07 mm/h, 95% IC da 3,04 a 5,11; $p<0,0001$). Il bias causato dalla conservazione a 4°C per 24 ore per i 2 campioni utilizzati come CQI con valori di VES di circa 15 e 50 mm/h è risultato, rispettivamente, pari a 3,6 (95% IC, 2,78-4,52) e 7,83 (95% IC, 5,77-9,88). I limiti di concordanza per i due livelli di controllo sono invece risultati pari a -0,83 e 8,14 per i valori di VES di circa 15 mm/h e -2,78-18,38 per i valori di VES di circa 50 mm/h.

Conclusioni e Discussione

La valutazione effettuata conferma i dati riportati in letteratura sulla riduzione dei valori di VES rispetto ai valori iniziali in campioni conservati per 24 ore a 4°C (pari a circa il 10-20% secondo la letteratura, e pari, nel nostro caso, al 26% per i livelli di VES di circa 15 mm/h e al 18% per i livelli di VES di circa 50 mm/h). L'utilizzo come controllo di qualità di campioni che abbiano valori di VES di circa 15 mm/h e 50 mm/h, valutando il bias calcolato in base ai valori di VES ottenuti su uno stesso campione analizzato entro 4 ore dal prelievo e dopo 24 ore a 4°C, permette di monitorare in modo adeguato l'accuratezza della seduta analitica.

C-17

EPIDEMIOLOGIA ED ASPETTI CLINICO LABORATORISTICI DEI DISORDINI PLASMACELLULARI

S. Orro[a], E. Ramo[a], R. Littera[b], G. La Nasa[b], G. Satta[a]

[a]Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche; [b]Centro Trapianti di Midollo Osseo - Reparto di Onco-Ematologia. Ospedale. "R. Binaghi" A.S.L. 8 - Cagliari – Sardegna

Scopo del lavoro

Le discrasie plasmacellulari rappresentano un gruppo di disordini eterogenei per caratteristiche cliniche e biochimiche, ad eziologia sconosciuta, caratterizzate da un'abnorme proliferazione monoclonale di elementi della linea linfoide B e dalla presenza nel siero o nelle urine di una componente polipeptidica con caratteri strutturali ed elettroforetici omogenei (monoclonali) costituita da immunoglobuline o da catene leggere k o λ.
Scopo dello studio è valutare le relazioni esistenti tra componenti proteiche monoclonali (proteina M) e i diversi tipi di malattie che ad esse si associano: Mieloma Multiplo (MM), Gammapatia di Significato Indeterminato (MGUS), disordini plasmcellulari quali Mieloma Solitario (SM), Macroglobulinemia di Waldenstrom (MW) e Amiloidosi (AM). Sono stati inoltre analizzati diversi fattori prognostici: età, sesso, dosaggio delle immunoglobuline, della β2-microglobulina, LDH e i diversi tipi della proteina M valutandone le correlazioni con i vari disordini plasmacellulari e l'influenza sulla loro evoluzione.

Materiali e Metodi

Dal Gennaio del 2000 al Giugno 2002 abbiamo esaminato 142 pazienti. La tipizzazione delle componenti monoclonali è stata effettuata mediante immunofissazione elettroforetica con metodica semiautomatica eseguita con Kit della AlfaBiotech (IFE CTE Jokoh)

Risultati

Sono risultati positivi alla proteina M sierica 83 pz. (58% del totale) dei quali 40 donne (48%) 43 maschi (52%). Abbiamo diagnosticato 26 MM (32 %), 42 MGUS (50%), 5 MW (6%), 1 SM (1.2%), 1 AM (1.2%). I restanti 8 casi (9.6%) si associavano ad altri disordini linfoproliferativi o rappresentavano delle gammapatie secondarie. Nel nostro gruppo di pazienti non abbiamo trovato una differente incidenza di malattia legata al sesso o all'età. Il 63% dei pazienti con componente proteica M era positivo per le IgG. Abbiamo inoltre riscontrato la prevalenza delle catene leggere K (61% dei casi) sia nei MM che nelle MGUS. Il 3.6 % dei pz. (2 MGUS, 1 MM) presentava una componente proteica M biclonale.

Conclusioni

Nel nostro gruppo di pz., a differenza di altri lavori (1), abbiamo riscontrato una maggiore frequenza di MGUS rispetto ai MM. Questa differenza potrebbe essere attribuita ad una precocità nella diagnosi che permetterebbe di diagnosticare quelle MGUS non ancora evolute a MM. Inoltre andrebbero indagate le relazioni esistenti tra la diversa incidenza di MGUS e MM e i polimorfismi genetici della popolazione Sarda.

Bibliografia

1 A clinical analysis of 798 cases of M protein positive patients. Chen S, Li Y, Zhang P, et Al. Zhonghua Nei Ke Za Zhi 2001 Jun;40(6):398-400

C-18

PARAMETRI RETICOLOCITARI IN EPOCA PRENATALE E NEONATALE

Mazzone R., Gaglioti P*., Pagliano M[♦]., Crema S., Garbarini S[♠]., Miserendino L., Mastretta E[♣]., David O.

Laboratorio Analisi O.I.R.M., *Unita' Materno-Fetale , [♣]Neonatologia, Azienda Ospedaliera O.I.R.M S.Anna, [♦]Dipartimento di Discipline Ginecologiche e Ostetriche , [♠]Cattedra di Neonatologia -Università di Torino; TO.

Premesse e scopi. Scopo del nostro studio è stato quello di misurare gli indici reticolocitari su sangue fetale in 22° settimana di vita intrauterina, in relazione con quelli ottenuti in epoca neonatale.

Casistica. Sono stati esaminati : 31 campioni di sangue fetale in 22° settimana di vita intrauterina, esenti da alterazioni ematologiche, aneuploidie, epato-nefropatie e con anamnesi familiare negativa per patologie ematologiche; - 27 neonati fisiologici a termine in prima giornata di vita con anamnesi familiare negativa per patologie ematologiche.

Metodica: l'esame emocromocitometrico e i parametri reticolocitari sono stati determinati su contaglobuli ADVIA120 (Technicon-Bayer), che utilizza filosofia laser –citochimica, in grado di misurare la concentrazione emoglobinica reticolocitaria.

Risultati: Sia i reticolociti, sia l'Hb reticolocitaria risultavano superiori a quelli del neonato a riscontro della alta attivita' eritropoietica e della ridotta vita eritrocitaria in detto periodo di vita fetale. Il rapporto CHCMr/ CHCMm < 1 conferma come anche nel feto sia presente una diminuita concentrazione dell' Hb reticolocitaria rispetto a quella dei globuli rossi (m). Il rapporto CHr / CHm e MCVr/ MCVm, modicamente ridotti rispetto i valori in epoca neonatale e nelle successive eta' della vita, riflettono probabilmente le variazioni dell' eritropoiesi in epoca prenatale (2).

Tabella 1: parametri reticolocitari (m ± SD)

	22 week	1 giorno
Hbm g / L	123.68 ± 11.75	191.46 ± 22.25
Hbr g/L	11.51 ± 2.80	8.45 ± 2.31
RBC x 10^9 /L	3.02 ± 0.44	5.39 ± 0.65
Ret x 10^6/ L	303.84 ± 74.97	237.85 ± 61.59
Ret %	10.10 ± 2.34	4.51 ± 1.22
MCVr Fl	123.45 ± 9.73	121.76 ± 5.73
MCVr/MCVm	1.07 ± 0.04	1.18 ± 0.03
CHCMr/CHCMm	0.89 ± 0.02	0.84 ± 0.02
CHr/CHm	0.95 ± 0.05	0.90 ± 0.02
Hbm/Hbr	11.4 ± 3.23	23.03 ± 5.87

Conclusioni: la messa a punto di parametri di riferimento degli indici reticolocitari potrebbe essere di utilita' nella diagnosi delle patologie ematologiche in epoca prenatale e neonatale.

Bibliografia. 1) Buttarello et all. Arch Pathol Lab Med 1995; 119: 1141
2) D'Onofrio et all. Blood 1995; 85: 818

C-19

ACCURATEZZA DELLA CONTA DEI LINFOCITI T CD4+ E CD8+ CON UN NUOVO METODO COMPLETAMENTE AUTOMATIZZATO PER L'ANALIZZATORE CELL-DYN 4000

G.Rubatta, M.Mori

Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale Galliera- via delle Mura Cappuccine, 16100 Genova

Introduzione.
La conta dei linfociti CD4+ e CD8+ è utilizzata per la classificazione delle leucemie e dei linfomi, per il monitoraggio della ricostituzione immunologica dopo trapianto e nei pazienti HIV per definire lo stato della malattia ed identificare i pazienti a rischio di infezioni opportunistiche. Allo stato attuale i laboratori eseguono questo tipo di analisi con il citofluorimetro, che richiede operatori dedicati, circa 40 minuti per eseguire il test ed espone al rischio di contaminazione con liquidi biologici infetti.

Scopo del lavoro
Su 47 campioni di pazienti HIV a differenti stadi di malattia, abbiamo valutato l'accuratezza di un nuovo metodo completamente automatizzato, veloce e da provetta chiusa, sviluppato per l'analizzatore Abbott Cell Dyn 4000.

Materiali e metodi.
La metodica utilizza la combinazione tra tecnologia MAPSS, per contare WBC e linfociti, e la doppia fluorescenza con anticorpi monoclonali marcati con FITC e PE, per individuare le sottopopolazioni T in sangue intero anticoagulato con K2EDTA. L'analizzatore è dotato di un argon laser ed esegue l'emocromo con la tipizzazione completa in meno di 8 minuti. Per la procedura di controllo di qualità, abbiamo utilizzato 2 campioni normali di sangue fresco, come si usa anche per i citofluorim. L'accuratezza del metodo è stata valutata verso il citofluorimetro (FACScan), su cui utilizziamo un pannello con 6 reagenti (TriTest) e una provetta TruCOUNT, per ottenere la conta assoluta delle sottopopolazioni.

Risultati.
I risultati della comparazione son stati eccellenti, come da tabella sottostante:

n=47	%CD3+	#CD3+	%CD4+	#CD4+	%CD8+	#CD8+	#Lym
r =	0.955	0.940	0.957	0.976	0.983	0.942	0.958
slope	0.910	1.086	0.937	1.010	0.969	1.107	1.069
intercept	7.974	0.055	1.466	0.043	2.248	0.007	-0.327

Conclusioni.
La nuova metodica si è dimostrata accurata quanto il citofluorimetro, con il vantaggio di essere completamente automatizzata, veloce e senza rischio per l'operatore.

C-20

MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE : ATTENTA VALUTAZIONE DEL LEUCOGRAMMA, ESAME MORFOLOGICO E CITOGRAMMA.

D.TANCA. G.L.DEVOTO. C.MARCHELLO. L.BRILLANTE.
ASL 4 CHIAVARESE-Settore Ematologia, Citometria e Coagulazione

Scopo del lavoro

Dimostrare l'utilità di una attenta valutazione del leucogramma ed dell'esame morfologico dello striscio periferico per arrivare ad una corretta scelta di monoclonali da utilizzare per una diagnosi di malattia linfoproliferativa accurata e precoce.

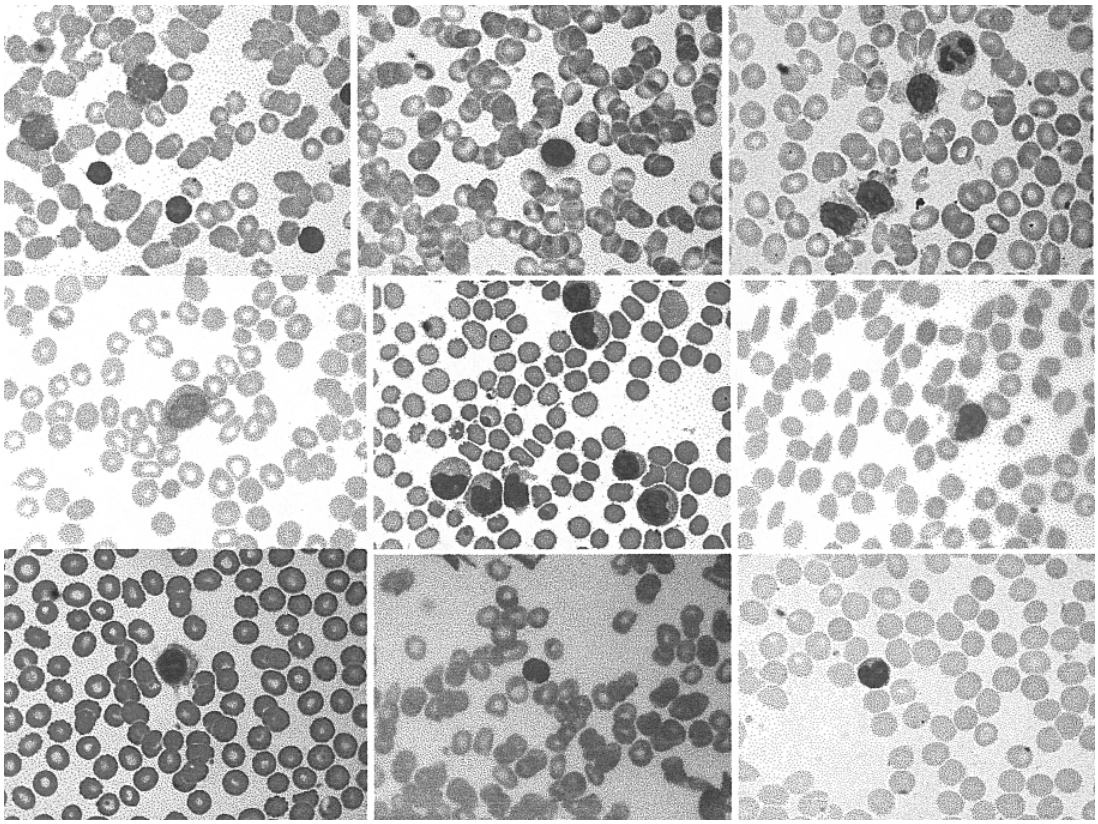
Materiale e Metodi

Emocromi di pazienti con linfocitosi assoluta maggiore di 5000 microlitri, strisci periferici colorati con May-Grunwald-Giemsa,ADVIA 120, FACSCAN, monoclonali di BD e VO.

Risultati

Nel nostro laboratorio dal 1999 al 2001 abbiamo diagnosticato le seguenti patologie:

1999	LLC-B : 18	LLC-T : 2	LINFOMI : 5
2000	LLC-B : 20	LLC-T : 5	LINFOMI : 8
2001	LLC-B : 25	LLC-T : 3	LINFOMI : 11



Discussione e conclusioni

Si puo'formulare una corretta diagnosi di malattia linfoproliferativa con un numero ristretto ,ma mirato, di monoclonali sulla base di informazioni preliminari sia morfologiche che cliniche.

C-21

LA CLONALITA' DEI LINFOCITI B IN CITOMETRIA A FLUSSO: CONFRONTO TRA DIVERSI ANTICORPI E CONIUGATI

P. Bulian, P. Doretto, P. Cappelletti

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Servizio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Pordenone

Scopo del lavoro

Nella diagnosi di malattie linfoproliferative B e' di fondamentale importanza la valutazione della clonalita' mediante analisi delle immunoglobuline di superficie con anticorpi anti-catene leggere. Nelle leucemie linfatiche croniche (LLC) frequentemente l'espressione di queste molecole e' molto bassa, ai limiti della risoluzione o non distinguibile dal controllo negativo. In questi casi e' importante utilizzare il reagente con la massima risoluzione. In commercio esistono reagenti premiscelati anti kappa Fitc e anti lambda Pe oppure anti kappa o lambda entrambi Fitc o Pe; esistono reagenti monoclonali e policlonali. Scopo del lavoro e' confrontare la sensibilita' e risoluzione di questi reagenti come rapporto tra fluorescenza del positivo e negativo.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati linfociti B (gating su CD19) di 10 soggetti normali e di 5 soggetti con LLC. In tutti la clonalita' e' stata determinata con i seguenti reagenti : kappa Fitc/lambda Pe Becton Dickinson (monoclonali murini), kappa Fitc/lambda Pe Immuno Quality , kappa Fitc/lambda Pe Beckman Coulter, kappa Pe/lambda Fitc Dako (tutti policlonali F(ab')2 da coniglio), kappa Fitc e lambda Fitc Biosource (policlonali F(ab')2 da capra). I campioni prima della marcatura sono stati lavati ed incubati con siero di coniglio a 37 gradi per 30'. I risultati sono espressi come rapporto tra fluorescenza del positivo e del negativo (controllo) secondo la formula:

$$\text{rapporto} = 10^{((\text{ch.pos} - \text{ch.contr})/256)}$$

dove ch.pos e ch.contr indicano rispettivamente il canale medio del positivo e del controlllo.

Risultati (rapporto tra fluorescenza positivo/negativo, medie dei soggetti normali)

	BD	IQ	Coulter	Dako	Biosource
kappa Fitc	13.4	12.4	10.4	-	15.2
lambda Pe	138.6	111	44.6	-	-
kappa Pe	-	-	-	170.9	-
lambda Fitc	-	-	-	45.4	16.7

Discussione e conclusioni

La rappresentazione simultanea delle immunoglobuline kappa e lambda permette una interpretazione piu' facile della clonalita' e una piu' facile identificazione di un eventuale legame aspecifico. Utilizzando entrambi gli anticorpi marcati Fitc in teoria si possono sovrapporre e confrontare gli istogrammi, ma in pratica questa operazione e' inficiata dal fatto che il coniugato Fitc e' mediamente piu' intenso sulle immunoglobuline kappa rispetto alle lambda. La risoluzione, a parita' di coniugato confrontato, e' risultata migliore nei prodotti Dako. Inoltre poiche' la clonalita' kappa e' piu' frequente la combinazione migliore e' senza dubbio quella in cui le immunoglobuline kappa sono coniugate con Pe, reagente piu' brillante, e le immunoglobuline lambda con il Fitc, al contrario della maggior parte dei reagenti premiscelati attualmente in commercio.

C-22

CONCENTRAZIONE SIERICA DI FERRITINA MISURATA CON METODI BASATI SULLO STANDARD NIBSC-WHO 80/602 E SULLO STANDARD NISBC-WHO 2° 80/578

M.Filippini[a], P.L.Piccoli[b], L.Bianchini[b], R.M.Dorizzi[a], A.Ferrari[a], P.Rizzotti[a]

[a]Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, [b]Servizio Immunotrasfusionale, Azienda Ospedaliera di Verona, Verona;

Scopo del Lavoro

Gli obblighi di legge che inseriscono la determinazione della concentrazione di ferritina nel siero nei soggetti che si sottopongono a donazione di sangue hanno indotto i servizi di Medicina di Laboratorio ed Immunotrasfusionale aziendali a valutare le prestazioni dei metodi per la determinazione di questa molecola. Lo scopo dello studio è stato quello di confrontare le prestazioni del metodo impiegato in routine, Immulite 2000 che usa lo standard 2° NIBSC-WHO 80/578 ed il metodo Sentinel che usa lo standard NIBSC-WHO 80-602.

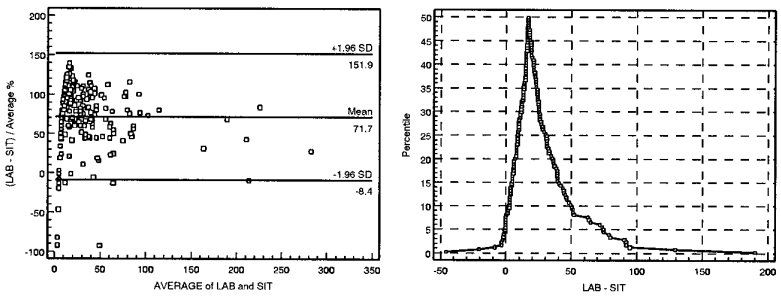
Materiali e Metodi

Sono stati raccolti 192 campioni di siero in soggetti donatori che si sono presentati al Servizio Trasfusionale del nostro ospedale: 42 non avevano eseguito alcuna donazione (20 M e 22 F) 52 avevano eseguito meno di 5 donazioni (27 M e 25 F) e 98 più di 5 donazioni (88 M e 10 F). Le determinazioni sono state eseguite seguendo le istruzioni del produttore su campioni freschi con reagenti Sentinel CH e l'analizzatore AMP (Johnson & Johnson, Milano) I campioni sono stati congelati a – 40 °C e sono stati rianalizzati in batch con reagenti ed analizzatore Immulite 2000 (DPC, Medical Systems, Genova).

Risultati

La media dei risultati con Sentinel è risultata 23.7 μg/L (± 32.29 μg/L) (Intervallo di Confidenza al 95% = 18.5-27.7); la mediana 12.35 (IC 95% = 9.41-15.96 μg/L); quella di Immulite 2000 è risultata 46.14 μg/L (± 50.01 μg/L) (IC 95% = 39.02-53.26); la mediana 30.9 (IC 95% =25.30-38.7 μg/L). L'equazione della retta di regressione (Passing-Bablok) è risultata Sentinel = -1.055 (Intervallo di confidenza al 95%: -2.235; 0.286) + 0.567 (IC 95% 0.428; 0.51) DPC. La correlazione è risultata 0.90 (IC 95% = 0.87-0.95).

La figura mostra il Bland Altman plot (sinistra) ed il Mountain plot (destra) della differenza dei due metodi.



Discussione e conclusioni

I risultati ottenuti confermano la rilevanza delle problematiche di consistenza dei risultati ottenuti con metodi diversi per la determinazione di ferritina soprattutto quando essi si basano su standard diversi (2° NIBSC-WHO 80/578 ottenuto da fegato umano e NIBSC-WHO 80-602 dalla milza). Anche se l'adozione da parte di tutti i produttori dello standard umano ricombinante (3° NIBSC 94/572) potrebbe migliorare la situazione i nostri dati suggeriscono che anche la diversità dell'anticorpo usato può influire (oltre ad un bias sistematico esiste una notevole dispersione dei risultati). L'indicazione del metodo impiegato per la determinazione delle ferritina potrebbe evitare errori nella interpretazione dei risultati da parte del clinico.

C-23

MONITORAGGIO DI SOGGETTI AFFERENTI AD UN CENTRO TRASFUSIONALE IMPIEGANDO METODI STANDARDIZZATI CON NIBSC-WHO 80/602 E NISBC-WHO 2° 80/578

M.Filippini[a], P.L.Piccoli[b], L.Bianchini[b], R.M.Dorizzi[a] S.Meneghelli[a], P.Rizzotti[a]

[a]Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, [b]Servizio Immunotrasfusionale, Azienda Ospedaliera di Verona, Verona;

Scopo del Lavoro

Gli intervalli di riferimento raccomandati dai produttori di metodi per la determinazione della ferritina cambiano notevolmente per cause analitiche (diversa standardizzazione e/o strumentazione) e biologiche (composizione della miscela di L e H isoferritina impiegata per la produzione dei reagenti impiegati nel dosaggio). Aspetto ancora più rilevante rispetto a questi è la capacità di un metodo di classificare i soggetti che afferiscono ad un Centro Trasfusionale per quanto riguarda la carenza marziale. Lo scopo dello studio è stato quello di confrontare le prestazioni di due metodi nel monitoraggio di soggetti che non sono sottoposti a donazione o che si sono sottoposti a < 5 e > 5 donazioni.

Materiali e Metodi

Sono stati raccolti 192 campioni di siero in soggetti donatori che si sono presentati al Servizio Trasfusionale della nostra azienda: 42 non avevano eseguito alcuna donazione (20 M e 22 F; rispettivamente gruppo A e B) 52 avevano eseguito meno di 5 donazioni (27 M e 25 F; gruppo C e D) e 98 più di 5 donazioni (88 M e 10 F;gruppo E e F). Le determinazioni sono state eseguite seguendo le istruzioni del produttore su campioni freschi con reagenti Sentinel CH e l'analizzatore AMP (Johnson & Johnson, Milano) (SIT). I campioni sono stati congelati a – 40 °C e sono stati rianalizziti in batch con reagenti ed analizzatore Immulite 2000 (DPC, Medical Systems, Genova) (LAB).

Risultati

La tabella riassume i risultati ottenuti nei diversi gruppi (M = media; DS= Deviazione Standard)

GRUPPO	DONAZ	ETA' (M)	ETA'(DS)	Hb (M)	Hb (DS)	SIT (M)	SIT (DS)	LAB (M)	LAB(DS)
A	0	25.8	9.34	151.8	8.6	62.8	58.1	117.3	78.11
B	0	35.4	10.99	133.3	9.9	11.7	6.94	33.2	22.91
C	2.44 (1.53)	32.8	8.66	151.1	8.2	40.7	46.91	71.5	67.02
D	1.44 (1.00	41	9.5	131	11.3	8.4	5.66	16.94	13.39
E	35.9 (28.66)	41.8	10.3	151	7.8	17.6	14.07	37.4	22.97
F	16.6 (10.49)	46.2	10.49	133.9	5.4	5.7	2.29	20.3	6.8

E' stata inoltre calcolata la significatività della differenza (test di Wilcoxon) tra la concentrazione di ferritina prima e dopo l'arruolamento come donatore. Entrambi i metodi non dimostrano nelle femmine una differenza statistica nella concentrazione di ferritina tra prima dell'arruolamento e dopo < 5 donazioni e tra questo gruppo e quello > 5 donazioni. Entrambi i metodi dimostrano una differenza statisticamente significativa tra gruppo < 5 donazioni e gruppo > 5 donazioni nei maschi; solo il metodo Immulite dimostra una differenza significativa (Student test p 0.007) tra non donatori e gruppo < 5 donazioni nei maschi.

Discussione e conclusioni

I due metodi considerati producono dei risultati assoluti molto diversi; tuttavia solo nel caso del confronto tra maschi non donatori e donatori < 5 donazioni la valutazione della variazione del deposito marziale dopo l'arruolamento è diversa.

C-24

PAZIENTI FERROCARENTI IN TERAPIA MARZIALE PARENTERALE E DEFICIT FUNZIONALE DI FERRO

G. Farina°, V. Temporin°, R. Ceravolo*, M. Buttarello°
° Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Geriatrico, Padova;
* Day Hospital Ospedale Geriatrico, Padova

Introduzione

L'anemia ferrocarente è il tipo di anemia che più frequentemente giunge all'osservazione dei laboratori clinici. E' importante avere a disposizione degli indicatori di verifica precoce della normalizzazione dell'eritropoiesi ferrocarente durante la terapia marziale.
Tra i parametri forniti dal sistema ematologico Bayer ADVIA 120, come indicatori precoci di risposta alla terapia marziale, vi sono il contenuto emoglobinico reticocitario (CHr) (calcolato come prodotto della concentrazione emoglobinica per il volume reticolocitario, i valori medi del quale sono espressi come MCHr), e la percentuale dei reticolociti a basso contenuto emoglobinico (% ret CH basso) definiti come la "percentuale di popolazione reticolocitaria con contenuto di emoglobina cellulare inferiore a 27 pg".
Durante l'osservazione seriale di alcuni pazienti in terapia marziale ev, mediante l'analisi quotidiana dei parametri reticolocitari, abbiamo osservato un andamento inatteso che dimostrerebbe l'insorgenza di una carenza funzionale di ferro, seppur transitoria.

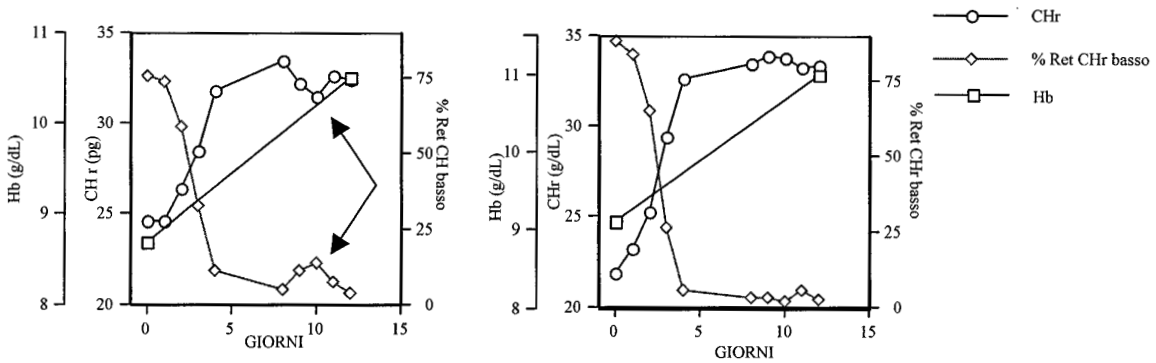
Materiale e Metodi

Abbiamo seguito due gruppi di pazienti ferrocarenti in terapia marziale ev. (VENOFER, 100mg/die) che si diversificavano per la modalità posologica: al primo gruppo (5 pazienti) è stato somministrato ferro ev per due settimane consecutive per un totale di 10 somministrazioni (sabato e domenica esclusi); al secondo gruppo (2 pazienti) la terapia è stata continuativa (sabato e domenica compresi) sempre per due settimane. Sono stati quotidianamente monitorati gli indici reticolocitari MCHr e % ret CHr basso su Bayer ADVIA 120.

Risultati

I grafici mostrano l'andamento dei parametri reticolocitari e dell'emoglobina (iniziale e finale) in due casi rappresentativi dei gruppi di pazienti durante il periodo di terapia.

PAZIENTE CON SOSPENSIONE DI TERAPIA PAZIENTI SENZA INTERRUZIONE DI TERAPIA



Discussione e conclusioni

Come si può notare l'MCHr e % di reticolociti a CHr basso hanno un andamento speculare e si modificano in modo significativo già al secondo giorno dall'inizio della terapia. Il dato interessante è che nei pazienti che hanno interrotto la somministrazione del ferro durante il fine settimana alla ripresa terapeutica del lunedì presentano una caduta più o meno accentuata del CHr ed un aumento speculare della % di reticolociti a CHr basso, seguita da una nuova ripresa durante la prosecuzione della terapia. Ciò non accade nei pazienti in cui la somministrazione di ferro è continuativa. La spiegazione può essere data dal fatto che i pazienti del primo gruppo vanno incontro ad un "deficit funzionale di ferro" alla sospensione della terapia.

C-26

PROTEINA S LIBERA: VALUTAZIONE CLINICA DEI RISULTATI OTTENUTI CON DIFFERENTI METODI DI STUDIO.

L. Simoni, A.M. Ottomano, A. Melegari, D. Campioli

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

Scopo del lavoro

Scopo del nostro lavoro è stata la valutazione di un metodo immunoturbidimetrico automatizzato per il dosaggio della Proteina S libera confrontandolo con un metodo immunoenzimatico (metodo di riferimento) in diversi gruppi di pazienti selezionati.

Materiali e metodi

Abbiamo esaminato 74 campioni di plasma congelato provenienti da diversi gruppi di pazienti selezionati: 18 positivi per resistenza alla Proteina C attivata (APC-r +), 20 positivi per la ricerca del Lupus Anticoagulant (LAC +), 13 pazienti in terapia anticoagulante orale (TAO), 5 con sospetta carenza di PS (PS def) e 18 donatori (popolazione di controllo). I campioni così selezionati sono stati esaminati con un metodo immunoturbidimetrico (IL Test Free Protein S - Instrumentation Laboratory) automatizzato su coagulometro BCT della ditta Dade-Behring, con un metodo immunoenzimatico (Asserachrom Free Protein S della ditta Roche) e con un metodo coagulativo automatizzato per la determinazione dell'attività funzionale della Proteina S (Protein S reagent; strumento: BCT Dade-Behring).

Risultati

Il confronto fra i risultati ottenuti con il metodo immunoturbidimetrico e quello immunoenzimatico ha mostrato una buona correlazione (r= 0.90) considerando la casistica nella sua globalità.
Abbiamo inoltre valutato i risultati non solo in funzione del dato numerico, ma dell' informazione clinica in rapporto agli intervalli di riferimento che sono: per il metodo IL Test Free PS 64-129 % per i maschi e 53-109% per le femmine; per il metodo Asserachrom: 70-120%; per il metodo coagulativo: 70-140%.
Analizzando i vari gruppi selezionati abbiamo ottenuto i risultati riassunti nella tabella:

	Asserachrom		*IL Test Free PS*		*PS coag*	
gruppo	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
APC-r +	1	17	0	18	16	2
LAC +	8	12	8	14	5	15
TAO	10	3	11	2	5	8
PS def	3	2	3	2	5	0
donatori	0	18	0	18	0	18

Discussione e Conclusioni

Il confronto statistico e la valutazione clinica dei risultati dimostra una buona correlazione fra il metodo immunoturbidimetrico (IL Test Free Protein S) e quello immunoenzimatico (Asserachrom). I pochi casi discordanti risultano tutti nella fascia di valori border-line.
In particolare il metodo IL Test Free Protein S ha presentato i seguenti vantaggi:si è rivelato automatizzabile e di facile esecuzione; non risente della resistenza alla Proteina C attivata e della presenza di anticorpi antifosfolipidi. Gli 8 casi positivi sono stati ottenuti in pazienti LAC positivi in TAO.
Infine i risultati ottenuti con il metodo coagulativo confermano le note interferenze in caso di APC-r positiva.

C-27

Il test ProCGlobal: l'esperienza del Laboratorio dell'Ospedale di Rovereto

A. Pupillo, M. Schinella, L.Barberi, B. Zenatti.
Laboratorio Analisi chimico-cliniche e Microbiologia; Ospedale S.Maria del Carmine – P.le S.Maria 6, 38068 Rovereto (TN)

SCOPO DEL LAVORO

Il sistema della Proteina C rappresenta un importante meccanismo di inibizione fisiologica della coagulazione; la sua carenza predispone il soggetto portatore ad un aumentato rischio di trombosi venosa.

E' stata valutata l'attività globale del sistema della Proteina C attraverso l'utilizzo del ProC Global: un test di screening che consente di rilevare carenze di Proteina C, Proteina S e Resistenza alla Proteina C attivata (Fattore V Leiden).

MATERIALI E METODI

Il ProC Global (Dade Behring) è un test basato su un APTT modificato che utilizza il Protac, ottenuto da veleno di serpente, per l'attivazione della Proteina C endogena. Il tempo di attivazione della Proteina C (PCAT) in presenza dell'attivatore è messo in relazione ad un analogo test (PCAT/0) in cui l'attivatore viene sostituito da un tampone. Per una migliore comparazione e riproducibilità dei risultati la ratio ottenuta con i campioni viene normalizzata (Ratio Normalizzata: RN) utilizzando un pool di plasmi normali precalibrato.

E' stato adottato il livello decisionale suggerito in metodica (R.N. < 0.8)

La determinazione del PCAT e PCAT/0 è stata effettuata sul Behring Coagulation Timer (BCT) della ditta Dade Behring.

Nel periodo ottobre 2001-maggio 2002 sono pervenute al nostro Laboratorio 298 richieste di ProC Global. Il numero maggiore (256) riguardava pazienti ambulatoriali di sesso femminile candidate all'uso di contraccettivi orali o di terapia postmenopausale; i rimanenti (42) erano pazienti ricoverati presso le Divisioni di Neurologia e di Medicina di Rovereto.

I campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti sodio citrato (0.11 mol/L) ed il plasma, ottenuto mediante centrifugazione, è stato aliquotato e congelato a -20 °C. Il giorno dell'esecuzione del test i plasmi sono stati scongelati a 37°C e testati entro due ore.

RISULTATI

292 campioni (98%) risultavano al di sopra del livello decisionale con una media di R.N. 1.27.

255 pazienti ambulatoriali presentavano valori superiori al livello decisionale e solo una paziente presentava valori inferiori; studiata con test di approfondimento, è risultata normale.

Tra i pazienti ricoverati sono stati evidenziati 5 valori al di sotto del livello decisionale (media R.N.=0.57). Si trattava di soggetti di età inferiore ai 50 anni ricoverati per eventi trombotici. I test di approfondimento effettuati su quattro pazienti presso un'altra struttura e a distanza dall'episodio acuto (misura dell'antitrombina, proteina C, proteina S, test per valutare la resistenza alla proteina C attivata, analisi del DNA per l'identificazione della mutazione del fattore V e della protrombina) hanno evidenziato la presenza di 3 mutazioni del Fattore V (Fattore V Leiden) ed 1 mutazione della protrombina. Non è stato possibile studiare una paziente perché già in terapia anticoagulante orale.

DISCUSSIONE

L'analisi dei dati ha evidenziato valori nell'ambito della normalità in una popolazione di soggetti sani sottoposti a screening prima di terapia estroprogestinica, mentre sono stati riscontrati valori patologici nei pazienti ricoverati per eventi trombotici, dove la richiesta del test è stata mirata.

L'approccio a questa metodologia ci ha consentito di maturare nuove esperienze in un ambito diagnostico da noi non ancora esplorato, permettendoci così l'introduzione di test più specifici (proteina C, proteina S e test di resistenza alla proteina C attivata) per lo studio della trombofilia.

Inoltre, tutto ciò ha consentito di incrementare e consolidare la collaborazione tra i medici, sia ospedalieri che di medicina generale, e il laboratorio per l'attuazione di una strategia concertata, che preveda una accurata selezione dei pazienti da sottoporre ai test più idonei.

C-28

POINT OF CARE IN EMOCOAGULAZIONE - DETERMINAZIONE DEL PT INR TRAMITE COAGULOMETRO PORTATILE

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia
Ospedale "A. Businco" via Jenner Cagliari

Porcu A., Porcu A., Loy A.M., Lochi M.F., Pasciu D., Mulas R., Porcu P.P., Sanna M.

Scopo del lavoro.

In questi ultimi anni, sono aumentate le indicazioni cliniche alla TAO (terapia anticoagulante orale) infatti oltre ai classici quadri clinici in cui era indicata (TVP, ictus, protesi valvolari cardiache biologiche e meccaniche) se ne sono aggiunte di nuove quali le prevenzione nella fibrillazione atriale cronica.
Di conseguenza c'è stato un incremento del numero dei pazienti in TAO (600.000 nel territorio nazionale) ed è destinato ad aumentare ulteriormente.
Da qui l'esigenza di migliorare la gestione dei pazienti sia in termini di tempo che di spazio.
Recentemente sono state introdotte nuove tecnologie per la determinazione del PT-INR su sangue intero che potrebbero rappresentare un'alternativa alla tradizionale gestione della profilassi e terapia anticoagulante. Tra questi i coagulometri portatili utilizzabili a domicilio.
La valutazione della loro affidabilità è stata confermata da diversi studi che hanno messo in evidenza una buona correlazione col dato standardizzato di laboratorio.
Scopo del nostro lavoro è verificare se uno di questi strumenti, il Coag-Check della ditta Roche, abbia dei risultati sovrapponibili a quelli ottenuti utilizzando lo strumento in dotazione al nostro laboratorio (CA-6000 della ditta Dade Behring).

Materiali e metodi

Un gruppo di 76 pazienti in TAO (41 maschi e 35 femmine di età compresa fra i 40 e i 68 anni), afferenti al nostro centro FCSA n°141 è stato sottoposto al controllo in doppio del valore di PT-INR: col metodo standardizzato di laboratorio e col coagulometro portatile.

Risultati

I risultati da noi ottenuti sono illustrati nella tabella sottostante

	CA6000	Coag-check
Intervallo di lettura	1--6.88	0.8--5.9
Media dei valori	3.19	3.01
Deviazione standard	1.23	1.05

Il coefficiente di correlazione calcolato è pari a 0.88.

Conclusioni

Da questi dati si rileva che il Coag-Check è uno strumento i cui dati sono sovrapponibili a quelli ottenuti in laboratorio. Sono state messe in evidenza però delle differenze fra le due letture quando i valori di PT-INR sono alti (maggiori o uguali a 5) che quindi suggeriscono che per questi valori è comunque raccomandabile un controllo eseguito in un laboratorio di riferimento.

Bibl: Reliability of a point of care coagulation monitor for INR determination: Slavec et al. Euromedialab 2001 S331

C-29

STUDIO DI TROMBOFILIA IN UNA POPOLAZIONE DI GIOVANI INFARTUATI : VALUTAZIONE DI ALCUNE ANOMALIE DELLA COAGULAZIONE

A. Vagni, E. Cancellieri, M. De Bernardis, M. Cazzamalli, A. Montanelli
Dipartimento di Patologia Clinica, Laboratorio Analisi, A.O. "Ospedale Maggiore di Crema"

Scopo del lavoro

La trombofilia è un insieme di quadri patologici caratterizzati per lo più da tromboembolismo ricorrente in età giovanile e nel quale è possibile rilevare una familiarità.
Generalmente le manifestazioni cliniche sono di tipo venoso (TVP degli arti inferiori, Embolia Polmonare, ma anche trombosi in sedi inusuali come quelle della vena porta o delle mesenteriche etc.); le manifestazioni trombotiche arteriose (IMA, ictus, TIA, trombosi retiniche, etc.) sono invece molto più rare.
Nell'ambito della patologia arteriosa l'Infarto Miocardico è uno degli eventi più frequenti, spesso fatali e con sequele cliniche importanti.
Scopo del nostro lavoro è stato ricercare le alterazioni trombofiliche presenti in un gruppo di soggetti selezionati sulla base della diagnosi di IMA giovanile, formulata con criteri biochimici ed elettrocardiografici dai colleghi del reparto di Cardiologia,

Materiali e metodi

Sono stati studiati 21 soggetti affetti da Infarto Miocardio Acuto (19 maschi e 2 femmine) di età compresa tra 38 e 53 anni.
Accordi preliminari intercorsi tra il personale di Pronto Soccorso e del Laboratorio Analisi hanno permesso la stesura di un protocollo d'indagine che prevedeva la raccolta anamnestica dei dati personali e familiari per ogni singolo caso clinico e l'esecuzione del prelievo subito dopo l'accertamento di IMA e prima di effettuare qualsiasi trattamento farmacologico.
Il pannello di test utilizzati per evidenziare la presenza di un'eventuale diatesi trombofilica comprende, oltre a test coagulativi di base (PT, PTT, Fibrinogeno, AT3), anche la determinazione dell'omocisteina (Abbott), degli anticorpi anti Cardiolipina e anti Beta2 glicoproteina I (Bouty) e del Fattore VII (Roche).

Risultati

Le indagini effettuate hanno evidenziato:

a) 2 pazienti con elevati livelli di fibrinogenemia
b) assenza di anticorpi antifosfolipidi (anti Cardiolipina e anti B2GPI) e di Lupus anticoagulant.
c) valori moderatamente aumentati di omocisteina plasmatica in 3 soggetti, ai quali è stata suggerita la ricerca genetica della variante termolabile della MTHFR.
d) livelli di Fattore VII significativamente aumentati in 4 casi.

Conclusioni

Nel nostro studio le sole alterazioni trombofiliche riscontrate in corso di IMA giovanile sono risultate essere : elevati livelli di omocisteina nel 14 % dei casi, di Fattore VII nel 19% , e di fibrinogeno nel 9%..
Questi dati sottolineano quanto a tutt'oggi il ruolo della bilancia coagulativa nel determinismo dell'evento ischemico miocardico, sia meritevole di ulteriori approfondimenti e chiarimenti e come l'anamnesi personale e soprattutto familiare debba ancora essere considerata un insostituibile primo step di approccio al paziente.

C-30

APPARENTE DEFICIT DI PROTEINA S IN UNA GIOVANE DONNA CON MUTAZIONE OMOZIGOTE DEL FATTORE V LEIDEN.

P.L.Schirru**,M.G. Zanda**,M. Loddo**,A.M Mulargia**, G.Meloni**, L.Floris* F. Tiddia°; M.D.Sofia°,.**Laboratorio di Ch.Clinica ed Ematologia, Az.Osp. G.Brotzu,Cagliari; °Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, P. O. S. Giovanni di Dio,Cagliari;*Clinica. Ostetrica e Ginecologia, P. O. S. Giovanni di Dio, Cagliari.

Introduzione

La Proteina S, glicoproteina vit.K dipendente, in cooperazione con la prot. Ca inibisce l'attività procoagulante dei fatt.V e VIII. A trasmissione autosomica dominante, si ritrova nel plasma in forma libera attiva (circa 40%) e in forma complessata al C4b binding protein (60%circa).Il deficit di Prot S può presentarsi sotto tre differenti forme: deficit totale, della sola forma libera, Prot.S disfunzionale.
Pertanto la determinazione della Prot.S deve essere effettuata con metodica funzionale, la quale è l'unica in grado di identificare tutte le forme di carenza. Bisogna però escludere eventuali carenze acquisite e considerare che il metodo funzionale può essere influenzato da presenza di mutazione del fattore V di Leiden (in subordine mutazione Cambridge.Aplotipo HR2).
Nel '93 Dahlback individuò un nuovo meccanismo responsabile di trombosi che denominò Resistenza alla Prot.C, e nel '94 Bertina dimostrò che l'APCr dipende da una mutazione puntiforme del Fattore V (sostituzione dell'arginina 506 in glutamina).
In definitiva il sistema Prot C/S è un inibitore della coagulazione e la sua alterazione è indice di rischio trombotico, cosi' come lo è la mutazione di Leiden che rende il fattore V resistente all'azione inibitoria del sistema Prot C/S.

Scopo del lavoro

Studio del profilo trombofilico di una donna di 28 anni all'inizio della 3° gravidanza per stabilire una correlazione tra coagulopatia e alterazioni fetali e instaurare una eventuale terapia al fine di portare a termine la gravidanza. La pz (pervenuta alla nostra osservazione alla 7° sett. di gestazione su indicazione del ginecologo) nel '93 aveva praticato aborto terapeutico per idrocefalia fetale e nell'agosto 2001 era stata sottoposta a taglio cesareo, alla 27° sett., per grave sofferenza fetale.Il neonato, prematuro e di basso peso per l'età gestazionale, decedette a otto giorni dal parto.
All'esame macroscopico la placenta mostrò ispessimento delle membrane amniocoriali ed ematomi subcorionici, mentre l'es. microscopico evidenziò ispessimento con sclerosi delle pareti dei vasi dei villi tronculari e staminali e infarti di epoca varia.

Materiali e metodi

In una prima fase esecuzione di PT-INR, Aptt, Fibr, AT III, LAC,Prot.C, Prot.S, APC-r, ACA IgG e IgM,omocisteina. Successivamente prot.S totale e libera, LAC con fosfatidiletanolamina esagonale, ab anti beta glicoproteina, il test di mutazione per il fattore V di Leiden, il Fattore II e MTHFR. In ultimo uno studio dei familiari (padre, madre e sorella).

Risultati:

Gli esami della prima fase sono risultati negativi ad eccezione della Prot.S e della APCr. Fra i parametri eseguiti successivamente sono stati confermati: l'alterazione della Prot S (con valori del 40% rispetto al normale) e della APC r, mentre il Fattore V di Leiden si è dimostrato mutato omozigote.Gli esami eseguiti sui familiari hanno mostrato: padre omozigote mutato per Fattore V Leiden; madre eterozigote per F. V Leiden; sorella eterozigote per Fattore V Leiden. Nella norma tutti gli altri parametri, compresa la Prot. S funzionale.

Discussione e Conclusioni

I primi risultati avevano evidenziato un deficit di Prot. S. Per questo motivo la giovane signora è stata sottoposta a trattamento con Clexane 6000 U/die. I tests di approfondimento, suggeriti dai risultati dello screening trombofilico, hanno evidenziato diatesi trombofilica dovuta alla omozigosi per il fattore V Leiden. Il deficit sarebbe responsabile delle gravidanze non portate a termine. Per quanto riguarda il deficit di Prot.S si è ipotizzato che sia dipendente dall'interazione con la mutazione del fattore V Leiden e pertanto sarebbe solo apparente.

C-31

VALUTAZIONE CLINICA DELLA CARENZA DI PROTEINA S: TRE DIVERSI METODI A CONFRONTO

M.L. Invidia, S. Plateroti, A. Martini, M. Zanellato, M. Saitta, B. Montaruli.

Laboratorio Analisi, CIOV – Ospedale Evangelico Valdese -, Torino

Scopo del lavoro

La proteina S (PS), è il cofattore necessario all'azione anticoagulante e profibrinolitica della Proteina C attivata, è presente nel plasma in due diverse forme: PS libera (40%) e PS legata al C4bBP (Complement C4b Binding Protein) (60%). Le due forme sono fra loro in equilibrio e solo la PS libera è funzionalmente attiva. La carenza di PS può essere sia congenita che acquisita ed è generalmente associata ad un elevato rischio di eventi tromboembolici venosi. Scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare il test immunologico al lattice per la determinazione quantitativa della PS libera (IL Test Proteina S libera) con il metodo in ELISA, fino ad ora considerato di riferimento, della Stago (Asserachrom Free Protein S, Stago). Abbiamo inoltre, confrontato la corrispondenza fra valori di PS coagulativa e i valori di PS free ottenuti con entrambi i metodi sopracitati.

Materiali e Metodi

Il plasma di 30 soggetti sani di controllo, 20 pazienti positivi per lupus anticoagulant (LA), 20 soggetti in terapia anticoagulante orale (TAO), 10 pazienti carenti di PS e 7 soggetti portatori della mutazione V Leiden è stato raccolto e studiato. Su tutti i campioni sono stati eseguiti il dosaggio coagulativo della PS (PS:C) e due diversi test per la determinazione quantitativa della PS libera: il test immunologico al lattice della IL (PSfree:Ag IL) e il test ELISA della Stago (PSfree:Ag Stago). Sia il test funzionale della PS che il test immunologico al lattice PSfree:Ag IL sono stati eseguiti sul coagulometro ACL9000 (IL).

Risultati

Media e deviazione standard dei valori di PS ottenuti nei soggetti normali con i metodi da noi utilizzati sono risultate rispettivamente: PS:C = 108±24; PSfree:Ag IL = 93±15; PSfree:Ag Stago = 101±23. I valori dei coefficienti di correlazione (Spearman e Rank) e le curve di regressione (Passing e Bablok) ottenuti confrontando fra loro i tre dosaggi della PS sono risultati: PS:C vs Psfree:Ag IL: r = 0,69; y = 0,9082x - 4,3184; PS:C vs PSfree:Ag Stago: r = 0,64; y = 1,2308x – 9,2923; PSfree:Ag IL vs. PSfree:Ag Stago: r = 0,66; y = 1,3397x – 5,7368. In tutti i pazienti con carenza congenita nota di PS si sono riscontrati valori di PS inferiori al cut-off calcolato sottraendo 2 deviazioni standard dalla media sia per la PS:C (cut-off = 60%) che per la PSfree:Ag IL (63%), per quello che riguarda la PSfree:Ag Stago, invece, tutti i pazienti meno uno (PSfree:Ag Stago = 118%, PS:C = 40%, PSfree:Ag IL = 50%) presentavano valori di PS inferiori al cut off (55%). 13/20 pazienti in TAO sono risultati carenti di PS:C e PSfree:Ag Stago; 5 dei restanti 7 pazienti sono risultati carenti di PS libera solo con il test della IL. 5 dei 20 pazienti LA positivi sono risultati carenti con la PS:C, di questi, uno è risultato carente anche di PS libera con entrambi i metodi da noi utilizzati. E' interessante sottolineare che, dei cinque pazienti LA positivi sopracitati, due sono risultati positivi per la ricerca di anticorpi anti-proteina S (Bouty), uno è risultato positivo per anticorpi anti-beta2glicoproteina I, gli ultimi due non sono stati sottoposti allo screening.

Dei 7 pazienti portatori della mutazione V Leiden analizzati, 6/7 sono risultati carenti di PS:C, tutti i pazienti, invece, sono risultati avere valori di PS libera nella norma.

Discussione e Conclusioni

In conclusione il test immunoturbidimetrico per il dosaggio della PS libera può essere considerato valido quanto il test della Stago, ma più veloce e di più facile utilizzo. Per quello che riguarda il dosaggio della PS:C oltre a sottolineare che non può essere sostituito dal dosaggio della PS libera nella ricerca delle carenze congenite di PS disfuzionale, potrebbe dimostrasi utile nell'identificare i pazienti LA positivi con anticorpi anti-proteina S, nei i pazienti LA positivi con anticorpi anti-proteina S da noi studiati, infatti, abbiamo risocntrato bassi livelli di PS:C e PS libera nella norma. .

C-32

ANTICORPI ANTI-PROTEINA S IN PAZIENTI CON MALATTIA TROMBOEMBOLICA

S. Plateroti , L. Cavagna, M.L. Invidia, M. Bazzan, A. Martini, M. Saitta, B. Montaruli.

Laboratorio Analisi, CIOV-OspedaleEvangelico Valdese, Torino

Scopo del lavoro

Gli anticorpi antifosfolipidi rappresentano un gruppo eterogeneo di immunoglobuline fortemente associate a disordini trombotici. Diverse proteine quali la β2 glicoproteina I (β2-GpI), la protrombina (PT), l'annexina V e la proteina S (PS) sono necessarie per il legame dell'anticorpo ai fosfolipidi (PL). Il ruolo degli anticorpi anti-proteina S (aPS) come fattore di rischio per evento trombotico, non è stato ancora ben stabilito. Scopo del nostro lavoro è stato quello di verificare la prevalenza degli aPS in pazienti con malattia tromboembolica venosa e/o arteriosa.

Materiali e Metodi

Abbiamo valutato la prevalenza degli aPS IgG e IgM (metodo ELISA, BOUTY) in 80 pazienti [52 femmine e 28 maschi, età mediana e (range): 53 (19-83)] con storia di trombosi venosa (69 casi) o arteriosa (11 casi).

Di questi, 6/80 presentavano una sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi già diagnosticata; 4/80 erano portatori della mutazione G20210A del gene del fattore II, 7/80 della mutazione V Leiden; 2/80 presentavano deficit di Antitrombina; 8/80 avevano una iperomocistinemia; 4/80 una neoplasia (1 carcinoma ovarico, 1 carcinoma mammario e 2 carcinoma al colon). 24 degli 80 pazienti analizzati risultavano essere positivi per almeno uno dei seguenti test per la ricerca di anticorpi anti-fosfolipidi: LA (24/80), aCL IgG (11/80), aCL IgM (10/20), aB2IgG (9/20), aB2IgM (7/80) aPTIgG (4/80) aPTIgM (3/80).

Risultati

Degli 80 pazienti studiati 19 (24%) sono risultati positivi per aPS (2/80 positivi per aPS IgG e IgM, 11/80 positivi solo per aPS di tipo IgG, 6/80 positivi solo per aPS IgM). 17/69 (25%) pazienti con evento trombotico di tipo venoso sono risultati positivi per aPS, di questi 12/14 positivi per aPS IgG e 5/14 positivi per aPS IgM. 5 degli 11 (45%) pazienti con trombosi arteriosa presentavano valori di aPS superiori al cut-off, di questi 2/11 sono risultati positivi per aPS IgG e IgM, 2/11 positivi per aPS IgG e 1/11 positivo per aPS IgM. E' interessante sottolineare che due dei pazienti aPS positivi avevano eseguito in concomitanza anche il dosaggio della proteina S funzionale e libera; per entrambi questi pazienti abbiamo riscontrato una carenza di proteina S coagulativa con valori nella norma di proteina S libera (sia con metodo immunoturbidimetrico che con metodo immunoenzimatico).

Discussione e Conclusioni

I risultati ottenuti nello studio da noi condotto evidenziano che gli aPS sono un fattore di rischio non solo, in accordo con quanto riportato in letteratura, per malattia trombotica venosa, ma anche per trombosi arteriosa. Ulteriori accertamenti sono necessari allo scopo di: 1) valutare la prevalenza di questi anticorpi nella popolazione sana; 2) confermare su un maggior numero di pazienti la loro associazione con l'evento trombotico venoso, ma soprattutto arterioso; 3) chiarire il ruolo di questi anticorpi sull'azione anticoagulante della proteina S.

C-33

VALUTAZIONE DI SEMPLICI PARAMETRI EMATOLOGICI ED EMOCOAGULATIVI IN 10 CASI DI SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDE (APS),TUTTI CONTRASSEGNATI DA EVENTI TROMBOTICI

C. Brera,°A. Canevari,• F. Pavesi°.

°Struttura Laboratorio Analisi di Lodi, Azienda Ospedaliera della Provincia di Lodi,•Clinica Ematologica, IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia.

Scopo del nostro lavoro è la valutazione multiparametrica dell'equilibrio emostatico in 10 pazienti affetti da APS e storia clinica caratterizzata da eventi trombotici (6 casi complicati da trombosi venosa e 4 casi da trombosi arteriosa).
Le indagini di laboratorio eseguite sono quelle riportate nelle tabelle 1 e 2 con i rispettivi risultati.
L'aggregazione piastrinica è stata valutata con i seguenti induttori: ADP(2 e 5 μM), Collagene (2 e 5 μg/ml) EPN(10μM), ACA(500μg/ml). Sono state dosate le proteine di attivazione piastrinica β TG e PF4.(ELISA) Gli anticorpi antipiastrina sono stati ricercati con procedura in fase solida.

Risultati : Tab 1 e Tab 2

Pazienti	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Range
Protrombina	107	79	80	110	97	107	95	110	107	75	70-120
aPTT R	1,4	1,27	1,31	3,24	2,99	1,89	1,99	0,89	1,63	1,29	0,9-1,15
Fibrinogeno	310	307	420	440	426	309	316	255	375	298	200-400
Lac Screen	56	50,4	45	130	113	70,8	74	45,2	64	49	
Lac Confirm	31	34,4	26	23	20,6	30,8	33	28,1	42	31	
Lac Ratio	1,8	1,46	1,73	5,65	5,48	2,29	2,24	1,6	1,52	1,58	0,8-1,2
ATIII	88	90	95	110	106	111	86	93	82	84	80-120
Proteina C	74	76	100	105	140	102	108	100	106	117	70-140
Proteina S	70	110	99	90	99	109	120	90	86	126	60-140
APC-R ratio	2,4	2,7	2,2	2	2,8	2,3	2,6	2,4	2,4	2,6	2,0-3,0
Piastrine	300	550	200	80	60	72	50	249	440	320	150-300000

Pazienti	APS Second	APS Primaria	Terapia	Senza Terapia	Piastrin	Anticorpi Antipiastrin	Aggregaz Piastrinica	B-TG e PF	LAC aCL
1	LES	-	ASA	-	300000	-	Riduzione	Aumento	+
2	LES	-	-	+	550000	-	Aumento	Aumento	+
3	LES	-	ASA	-	200000	-	Riduzione	Normale	+
4	LES	-	-	+	80000	+	Aumento	Aumento	+
5	LES	-	Deltacorten	-	60000	+	Normale	Aumento	+
6	LES	-	ASA	-	72000	+	Riduzione	Aumento	+
7	LES	-	ASA	-	50000	+	Riduzione	Aumento	+
8	-	+	-	+	249000	-	Aumento	Aumento	+
9	-	+	-	+	440000	-	Normale	Normale	+
10	LES	-	ASA	-	320000	-	Riduzione	Normale	+

Discussione e Conclusione:

tutti i casi hanno presentato allungamento dell'aPTT con la conferma dei test specifici (LAC confirm). Il meccanismo sottostante alla tendenza trombotica della APS non è ancora stato definito ed è verosimilmente in relazione alla specificità degli anticorpi antifosfolipide(aPL), al livello, ai cofattori proteici plasmatici (Beta 2GP1,protrombina, proteina C ed S). La precisa caratterizzazione degli aPL nonché gli effetti ematologici ed emostatici degli stessi rappresentano un'importante obiettivo da ricercare per la comprensione del ruolo di tali autoanticorpi nella trombofilia e nella stratificazione del rischio.
L'analisi di semplici test di questa serie di casi, tutti contrassegnati da evento trombotico, ha documentato costante positività nel tempo sia degli anticorpi LA sia degli anticorpi aCL, non infrequente positività associata degli anticorpi antipiastrine, frequenti segnali di attivazione piastrinica. La valutazione da noi attuata e comprendente oltre alle prove fondamentali per la conferma diagnostica di aPL anche test complementari, appare razionale nell'intento di meglio stratificare il rischio trombotico.

C-34

DOSAGGIO DEL D DIMERO IN DIVERSE CONDIZIONI PATOLOGICHE: TRE METODI A CONFRONTO

R.Beneventi, C.Satriani,R.Carbonella,M.Bovio,M. Caruso, G.M. Uccheddu, B. Nocera
U. O.Laboratorio di Patologia Clinica Direttore dr. A. Picerno
Nucleo Operativo Laboratorio di Urgenza Responsabile dr. R. Beneventi
Azienda Ospedaliera San Carlo
Potenza

Introduzione: Molti studi apparsi in letteratura negli ultimi anni consigliano la determinazione del D Dimero in diverse situazioni patologiche: Embolia polmonare, Gravidanza a rischio, Artroprotesi di anca, Ischemia cerebrale acuta, trapianto di fegato, Leucemie acute ,PTCA, Tromboembolismo venoso

Scopo del lavoro: Gli autori si sono prefissati lo scopo di fornire in tempo breve, in regime di urgenza, un dosaggio attendibile del D Dimero soprattutto nelle patologie in cui tale esame risulta dirimente(Embolia Polmonare e Gravidanza a rischio)

Materiali e Metodi: Sono stati messi a confronto tre metodi per la determinazione :
Metodo Qualitativo [D Dimer Test DADE test di agglutinazione su plasma citratato (1:9)]
Metodo Semiquantitativo Su sangue intero citratato o eparinato su strumento utilizzato in point of care (ROCHE utilizzato in Terapia Intensiva ed al Pronto Soccorso ed in sperimentazione presso il Laboratorio di Urgenza)
Metodo Quantitativo (Tecnica in Elisa) su strumento Mini Vidas (BIOMERIEUX)
Sono stati esaminati dal 30/12/2001 al 30/6/2002 N. 320 soggetti : 150 maschi e 170 femmine così divisi per patologia:
18,75% per Protesi di anca
21,87% Gravidanza a rischio comprese gravidanze gemellari e plurime ed eclampsie gravidiche
4.69% Embolia polmonare
6,25% Trombosi venose

Risultati: Dall'analisi dei risultati in nostro possesso si evince che i tre metodi sono sovrapponibili anche se emergono alcune discrepanze tra il metodo qualitativo ed i metodi semiquantitativo e quantitativo
Le differenze maggiormente significative si evidenziano soprattutto nei casi Bord Line basati soprattutto sull'età dei pazienti ed alla patologia specifica (specie Gravidica)
I casi dubbi all'esame qualitativo e definibili bord line al metodo semiquantitativo vengono meglio definiti come negativi all'esame quantitativo (soggetti di età superiore ai 70 anni con valori compresi quantitativamente fra 500 e 1000ng/ml)
Nella patologia gravidica sopra indicata i risultati risultano più controversi in quanto risultano positivi al metodo qualitativo , bord line al semiquantitativo e negativi al metodo quantitativo

Discussioni e conclusioni: Il test D Dimero qualitativo dai risultati del nostro studio mostra, senza ombra di dubbio il metodo più efficace e veloce adatto ad un laboratorio di urgenza in quanto ha una buona sensibilità e specificità comparabile con i test semiquantitativi e quantitativi tuttavia una diagnosi certa ed inconfutabile necessita di una conferma ottenibile solo con il metodo quantitativo che per i tempi di attesa mal si adatta al temnpo di risposta degli esami di urgenza. Per quanto attiene al test semiquantitativo può essere ben applicato come point of care ma comunque va confermato con il test quantitativo

BIBLIOGRAFIA

1)Gaffney PJ Fibrin Degradatio Products. Lancet 2, 1422 (1972)
2)Mirshahi M, Soria J , Soria C et al A latex immunoassay of fibrin/fibrinogen products in plasma using a monoclonal antibody . Throm Res 44,715-728 (1986)
3) Hirsch J. Diagnosis of venous thrombosis and pulmonary embolism Am: J. Cardiol 65-45c 50c (1990)

C-35

COME VALUTARE IL DANNO ENDOTELIALE NELLE TROMBOSI.

Vera Fuduli, Maria Giuseppina Scarmozzino, Antonia Dardano, Domenico Consoli *
Cattedra ed U.O. di Patologia Clinica, DMSC, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi "Magna Græcia" Catanzaro; U.O. Neurologia, A.O. Vibo Valentia*

Scopo del Lavoro

L'attività anticoagulante dell'endotelio può essere modificata per alterazioni sia dei componenti strutturali del tessuto sia di quelli molecolari del sistema della coagulazione-fibrinolisi. Tra i componenti strutturali Annessina V, che appartiene ad una famiglia di proteine che legano Ca^{++} e fosfolipidi, ben conservate nel corso della evoluzione, svolge attività anticoagulante esercitando i suoi effetti biologici sull'endotelio vascolare, autoassemblandosi ordinatamente sui fosfolipidi di membrana, mediante la stabilizzazione dei quattro domains polipeptidici, a formare uno scudo protettivo antitrombotico. Altrettanto importante è il ruolo svolto dai componenti molecolari, in particolare dalla Protrombina, quale fattore essenziale per la fisiologica interazione tra endotelio e sistema della coagulazione. In questo studio riportiamo dati di laboratorio che, assieme alle evidenze cliniche, contribuiscono alla valutazione del ruolo degli autoanticorpi anti-Annessina V ed anti-Protrombina nella patogenesi della malattia trombotica.

Materiali e Metodi

In questa fase dello studio sono stati arruolati 73 pazienti adulti, di entrambi i sessi ed età compresa tra 20 e 50 anni. Tutti, al momento del ricovero, avevano un episodio di trombosi arteriosa centrale o periferica o ne avevano avuto uno o più di uno negli ultimi tre anni. In tutti i pazienti sono stati dosati, con metodiche di routine, aPTT, PT, ATIII, Fibrinogeno, D-Dimero, Proteina C-Proteina S (STA-C, Roche Diagnostic, Milano) e gli autoanticorpi ACL. Per questo studio sono stati dosati gli autoanticorpi IgM anti-Protrombina utilizzando un kit Elisa ORG 541, Orgentec Diagnostika GmbH, e gli autoanticorpi anti-Annessina V, utilizzando un kit Elisa human anti-Annexin V 41EH0001 (Technogenetics, Milano). Gli stessi parametri sono stati studiati su una popolazione di controllo di soggetti clinicamente sani, della stessa fascia di età.

Risultati

Dei 73 pazienti arruolati per questo studio, tutti sono risultati positivi per gli anticorpi ACL dell'isotipo IgG o IgM, e circa il 50% mostravano la doppia positività. Di tutti i pazienti solo 1 ha mostrato livelli patologici di anticorpi anti-Annessina V (cut-off $\geq$12.5 ng/ml), mentre 11 hanno mostrato livelli di anticorpi anti-Protrombina superiori a quelli del cut-off (10 U/ml). Al primo dosaggio, il paziente positivo per anti-Annessina V, era positivo anche agli anticorpi anti-Protrombina. Entrambi i parametri, cosi come la fibrinogenemia, sono rientrati nei limiti di riferimento in seguito a terapia.

Discussione e Conclusioni

I dati di questo studio concordano con quelli da noi ottenuti in precedenza e suggeriscono un algoritmo di laboratorio nel quale il dosaggio, con metodica ad elevata specificità, degli autoanticorpi anti-ACL potrebbe servire da indagine di base anche nei pazienti con trombosi arteriose sia centrali che periferiche, poiché la positività a questa indagine indica una patogenesi autoimmunitaria.

Le evidenze cliniche ed i dati di laboratorio presentati in questo studio suggeriscono che è possibile distinguere tra i pazienti anti-ACL positivi quelli che, con elevati valori di autoanticorpi anti-Protrombina, appartengono ad un gruppo che può andare incontro ad episodi, anche ricorrenti, di trombosi arteriose sin dall'età giovanile. Il riscontro della positività agli anticorpi anti-Annessina, nei pazienti da noi studiati, è inusuale poiché questi anticorpi sono esclusivamente coinvolti nel danno endoteliale placentare.