D-01

Effetti dell'ozono sugli asmatici allergici.

A. Gianotti
Dipartimento di Patologia Clinica - ASL 3 - Genova

L'ozono è prodotto dall'azione della luce solare su ossidi di azoto e su idrocarburi reattivi, emessi dai veicoli a motore e dagli impianti industriali. Il suo accumulo è tipico dei centri urbani che godono di clima mite quali quelli dell'area mediterranea. Gli effetti dannosi sulle vie aeree dell'inquinamento atmosferico sono stati segnalati in vari studi.

Materiali e metodi

Abbiamo testato 21 pazienti asmatici allergici al dermatophagoides pteronyssinus, 14 maschi e 7 femmine, in due periodi dell'anno. A ottobre dopo 1 h di nuoto in piscina, quindi in ambiente indoor e a giugno, dopo 1 h di footing in condizioni di elevate concentrazioni di ozono atmosferico.

N (14-18 anni)	Periodo	Ambiente	IgE tot. (m +/- DS)	Eos-Neut/escreato	PEF
21	ottobre	indoor	147 +/- 64	+ =	> 3%
21	giugno	outdoor	201 +/- 56*	++ +	<10%

* $p<0.05$

Tutti i soggetti testati svolgevano attività sportiva (nuoto e footing) in maniera continuativa; i controlli sono stati condotti in periodi privi di episodi asmatici e con pazienti che non assumevano broncodilatatori e/o cortisonici.

Risultati

I parametri presi in considerazione e cioè la produzione di IgE totali (marker di allergia), la variazione quantitativa degli eosinofili e dei neutrofili nell'escreato (markers di allergia e flogosi), la caduta del picco di flusso espiratorio rispetto al valore basale (marker di broncoostruzione) hanno chiaramente dimostrato che elevate concentrazioni di ozono peggiorano le condizioni dei pazienti asmatici allergici.

Discussione

Questi dati confermano quanto già segnalato in soggetti asmatici allergici nei quali, una preinalazione di ozono, ha dimezzato la concentrazione di allergene necessaria ad indurre una risposta broncoostruttiva rispetto agli asmatici che hanno inalato aria non inquinata prima di effettuare lo stesso test di provocazione con allergeni. Occorre pertanto, oltre a norme legislative che fissino standard di qualità dell'aria, un attento monitoraggio degli inquinanti; quando i livelli di ozono sono molto elevati è altamente raccomandabile che sia diminuita l'esposizione e ridotta l'attività sportiva soprattutto in quei pazienti che presentano difetti nella funzionalità respiratoria.

D-02

POLLINOSI E IgE NEL TERRITORIO DELLA A.S.L. N°8 DI CAGLIARI : ESPERIENZA IN UN OSPEDALE PNEUMOLOGICO

S. Orro . E. Ramo

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche Ospedale " R. Binaghi " A.S.L. N° 8 CAGLIARI

Scopo del lavoro

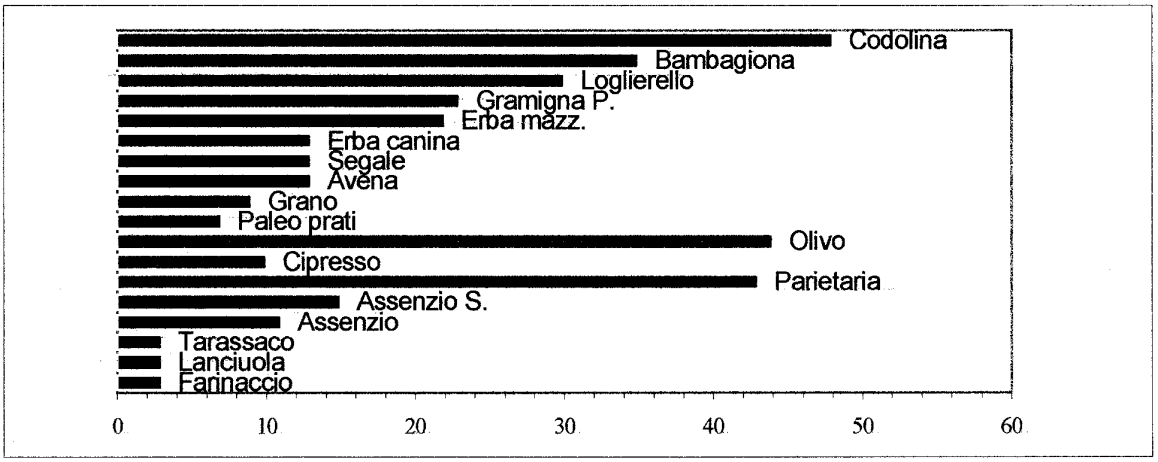
Abbiamo verificato quali sono state le pollinosi più frequenti nel circondario cagliaritano nel periodo che va da Gennaio 2001 al Giugno 2002 valutata in base alla ricerca di anticorpi IgE verso allergeni specifici. Vogliamo indicare con il termine pollinosi quella patologia IgE mediata, che si manifesta in particolari periodi dell'anno caratterizzata da oculorinite e-o asma.

Materiali e Metodi

Sono stati esaminati 323 pazienti provenienti oltre che dalle divisioni pneumologiche del nostro ospedale anche dai vari punti prelievo dislocati nell'ambito della A.S.L. N°8 di Cagliari. Sui campioni sono stati dosati i livelli ematici per IgE specifiche verso gli allergeni più frequentemente in causa nella pollinosi (graminacee, alberi ed erbe). Per alcuni campioni la ricerca era mirata verso un singolo allergene, mentre nella maggioranza dei casi era indirizzata verso allergeni plurimi.
L'indagine è stata condotta utilizzando una metodica fluoroimmunoenzimatica (test UniCap-Pharmacia). Il test fornisce un dosaggio quantitativo.

Risultati :

Tabella : Prevalenza percentuale delle principali sensibilizzazioni



Discussione e Conclusioni

In conclusione, fatta eccezione per le graminacee,la prevalenza delle sensibilizzazioni polliniche non si presenta in modo uniforme nel territorio nazionale ma risente di numerosi fattori quali clima distribuzione geografica etc. I nostri dati, ricavati dall'esame della nostra casistica, confrontati anche con quelli della letteratura, confermano la prevalenza assoluta sulla sensibilizzazione alle graminacee seguita da una leggera prevalenza dell'ulivo sulla parietaria.

D-03

PREVALENZA DELLE IGE SPECIFICHE IN UNA POPOLAZIONE PEDIATRICA.

R. Bandettini, M. Cingolani, G. Nattero, B.O. Iovovich, G. Parodi, G. Di Maira, S. Mangraviti.
Laboratorio Analisi chimico-cliniche e Microbiologia – Istituto Giannina Gaslini, GENOVA.

Scopo del lavoro

Le malattie allergiche sono legate alla predisposizione individuale a produrre immunoglobuline E verso i comuni antigeni ambientali e/o alimentari. Nella diagnostica di laboratorio delle allergopatie la determinazione delle IgE specifiche è di fondamentale importanza e lo scopo del nostro lavoro è stato quello di quantificarne la prevalenza nell'arco di un anno.

Materiali e metodi

Tra luglio 2001 e luglio 2002 abbiamo testato il siero di 4450 pazienti in età pediatrica, afferenti alle strutture ambulatoriali e/o di ricovero del nostro Istituto, a cui era stato richiesto il dosaggio di IgE specifiche. Il test è stato effettuato con metodo immunoenzimatico quantitativo che prevede l'espressione dei risultati in classi da 0 a 6 a seconda della concentrazione degli anticorpi in KU_A/l (Pharmacia CAP System).

Risultati

I dati ottenuti sono schematizzati nella seguente tabella:

	TOTALE	POSITIVI	%
ACARI	4985	1721	34,5
ALBERI	2970	238	8,0
ALIMENTI	10306	314	3,0
EPITELI	4230	302	7,1
ERBE	3580	447	12,5
GRAMINACEE	3565	371	10,4
MUFFE	824	44	5,3
TOT. ALLERGENI	30460	3474	11,4

Discussione e Conclusioni

In questo studio abbiamo elaborato solo quei campioni che appartenevano ad una classe superiore o uguale alla 2° ($\geq$ 0.70 KU_A/l). La concentrazione di IgE specifiche in questa classe è moderata e clinicamente non rilevante ma può contribuire a evidenziare i fattori di rischio.

Dall'analisi dei dati si evidenzia che le positività più significative sono verso gli acari e i pollini, in particolare:

- si ha una positività maggiore verso gli acari della polvere (34,5%) in particolare verso *Dermatophagoides pteronyssinus*;
- nel gruppo delle erbe (12,5%), abbiamo la netta prevalenza di *Parietaria judaica* e *Parietaria officinalis*;
- tra le Graminacee (10,4%) gli allergeni più rappresentati sono *Lolium* e *Gramigna*;
- la positività verso i pollini degli alberi (8,0%) è diretta, con un'ampia percentuale, verso l'Olivo rispecchiando le caratteristiche ambientali della nostra regione;
- per quanto riguarda gli allergeni alimentari abbiamo riscontrato una bassa percentuale di positività (3,0%) maggiormente indirizzata verso le componenti dell'uovo e del latte.

D-04

IGE SPECIFICHE VERSO INALANTI E CALENDARIO POLLINICO

R. Bandettini, M. Cingolani, G. Nattero, B.O. Iovovich, G. Di Maira, G. Parodi, S. Mangraviti.
Laboratorio Analisi chimico-cliniche e Microbiologia – Istituto Giannina Gaslini, GENOVA.

Scopo del lavoro

Gli allergeni inalanti, responsabili delle reazioni allergiche, si dividono in due gruppi: perenni e stagionali. I primi comprendono gli acari e gli epiteli, mentre i pollini e le spore fanno parte del secondo gruppo. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare la prevalenza delle IgE specifiche verso allergeni inalanti e il calendario pollinico.

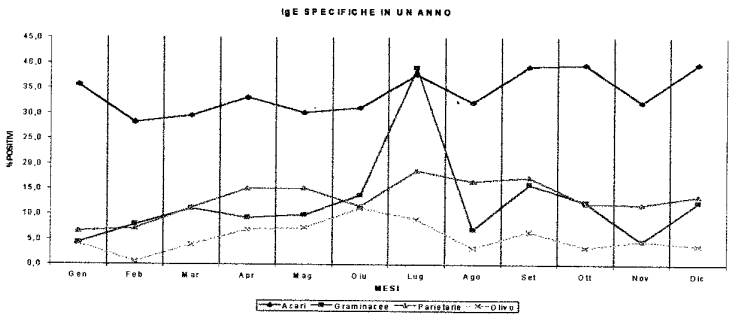
Materiali e metodi

Abbiamo analizzato retrospettivamente la routine allergologica del nostro laboratorio ed elaborato i dati relativi alle IgE specifiche verso i più comuni inalanti (Acari, Graminacee, Parietaria e Olivo). Le IgE sono state titolate sul siero di pazienti afferenti alle nostre strutture ambulatoriali a cui era stato richiesto il RAST. Il test è stato eseguito con metodo immunoenzimatico quantitativo che prevede l'espressione dei risultati in classi da 0 a 6 a seconda della concentrazione anticorpale in KU_A/l (Pharmacia CAP System).

Risultati

Le percentuali di positività significative (classe ≥ 3) sono riportate nella tabella e nel grafico seguenti:

	Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Set	Ott	Nov	Dic
Acari	35,7	28,2	29,5	33,0	30,0	31,1	37,7	32,1	39,2	39,6	32,1	39,8
Graminacee	4,2	7,9	11,0	9,2	9,8	13,6	39,0	6,9	15,9	12,3	4,6	12,3
Parietarie	6,5	7,2	11,1	15,0	15,1	11,5	18,7	16,4	17,3	12,0	11,9	13,5
Olivo	4,1	0,5	3,9	6,9	7,2	11,1	8,9	3,3	6,5	3,4	4,7	3,8



Discussione e conclusioni

Dall'analisi della tabella e del grafico si evince che la reattività più rilevante, che peraltro rimane costante durante l'anno, si ha verso i *Dermatophagoydes*, mentre, come da aspettative, i picchi pollinici sono seguiti da incrementi, più o meno cospicui, delle IgE specifiche verso i rispettivi allergeni (Graminacee, Parietarie e Olivo). In particolare, la positività verso le Graminacee fa registrare un picco rilevante (39%) nel mese di luglio, mentre la reattività verso la Parietaria rimane ad un livello costante da aprile a settembre, periodo di massima fioritura. L'Olivo, nonostante sia molto diffuso sul nostro territorio, si mantiene con basse percentuali di positività.

D-05

LA CITOLOGIA NASALE NEL MONITORAGGIO DELLA RINITE ALLERGICA

M.P.Ferrero,A.Bairo,S.Basto,M.Comandini,P.Fois,L.Lorenzon,S.Marchello,M.Scudo,V.Ricca.
Laboratorio analisi Koelliker – Osp. e Casa di Cura dei Missionari della Consolata, Torino

INTRODUZIONE

La rinite allergica da acari e' un quadro clinico frequente anche nell'infanzia, caratterizzato da segni e sintomi tipici: rinorrea, starnutazione, prurito, ostruzione, e sostenuto da un infiltrato flogistico della mucosa nasale, che permane anche in assenza di sintomatologia conclamata (flogosi minima persistente). Talora è possibile la sua evoluzione in asma.
Il trattamento terapeutico nell'età infantile si avvale generalmente di antiH1 per via sistemica associati a steroidi topici con schemi di durata variabile, spesso lasciati alla discrezione dei genitori, che si regolano in rapporto alla sintomatologia del bambino, ma senza un controllo oggettivo dell'andamento clinico.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del nostro lavoro e' stato quello di verificare la possibilità di utilizzo e l'efficacia della **citologia nasale** nel valutare l'andamento della flogosi in corso di terapia antiallergica e la sua correlazione con la sintomatologia, al fine di ottimizzare tale terapia.

PAZIENTI E METODI

Sono stati valutati 16 pazienti di eta' compresa tra 5 e 12 anni (età' media 7,9), sette femmine e nove maschi affetti da rinite allergica persistente da oltre sei mesi, clinicamente correlabile con la sensibilizzazione ad acari e/o gatto, dimostrata con SPT (almeno 3 mm di pomfo) e/o IgEs (almeno superiori a 0.7 KU/l). Tutti risultavano sensibilizzati agli acari e 4 anche al gatto. In tutti i casi di cutisensibilizzazione al gatto, esso era presente nell'ambiente di vita del bimbo.Tutti i pazienti sono stati trattati con: a) un antistaminico per via orale per tutta la durata della valutazione (due mesi) b) uno steroide topico per la prima settimana di ciascuno dei due mesi di terapia. L'andamento è stato monitorato citologicamente e sintomatologicamente prima dell'inizio, e settimanalmente per tutto il periodo del trattamento, con un totale di nove rinocitogrammi (T0 – T9) per paziente. Per il monitoraggio citologico e' stato impiegato il rinocitogramma standardizzato, il cui grado può variare da 0 a 4 in rapporto con il numero e la tipologia delle cellule dell'infiltrato. Per la valutazione sintomatologica e' stato utilizzato uno schema a punteggio, che, considerando 2 segni, rinorrea e starnutazione e 2 sintomi, prurito ed ostruzione, attribuisce da 0 a 4 punti ciascuno, in rapporto con la loro intensità'. In aggiunta alla sintomatologia nasale si è valutata quella bronchiale con due sintomi tosse e respiro corto, sempre con una scala da 0 a 4 per ciascuno.Il materiale citologico da esaminare è stato raccolto per scraping nasale mediante tampone, eluito in soluzione e quindi citocentrifugato a 800 r.p.m. per 3 minuti.

RISULTATI

Il grado di flogosi valutato con il rinocitogramma ha evidenziato una riduzione nel corso della terapia, più marcata nella settimana di associazione antiH1 e steroide topico, ma ancora molto buona in quelle con il solo antiH1. Parimenti la sintomatologia è andata riducendosi nel periodo del trattamento, ma confrontando il grading citologico e quello sintomatico, si è notato che anche in totale assenza di sintomi, la presenza di un grado d'infiltrato di 2 o più, concordava con un'instabilità del controllo sintomatologico, in particolare quando si aveva una persistenza di eosinofili.

CONCLUSIONI

La valutazione citologica nasale è di semplice e rapida esecuzione, di basso costo, poco fastidiosa anche per la popolazione infantile e consente di valutare l'adeguatezza del trattamento terapeutico in atto o la necessità di una sua variazione, prima e più efficacemente di altri tests più invasivi e costosi.

D-06

VALUTAZIONE PRELIMINARE DEL PHADIATOP INFANT IN BAMBINI CON SOSPETTO DI PATOLOGIA ALLERGICA

B.Caruso, N. Melloni, R.Dorizzi, P.Rizzotti

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche , Ospedale Civile Maggiore di Borgo Trento, Azienda Ospedalierra di Verona.

Scopo del lavoro

Con la denominazione di Phadiatop infant (Pharmacia - Upsala) viene proposto un test qualitativo in grado di individuare soggetti con sensibilizzazione ai principali alimenti ed inalanti in età pediatrica con l'ipotesi di identificare uno stato atopico. Nel nostro lavoro si è voluto per primo valutare la capacità di questo test di individuare bambini con probabile patologia allergica rispetto ai livelli di IgE totali . Inoltre essendo il Phadiatop infant un test composto da diversi allergeni in grado di evidenziare anche bassi titoli di IgE specifiche per alimenti e per inalanti abbiamo voluto dimostrare questa sua capacità.

Materiali e Metodi

Sono stati eseguiti i dosaggi del Phadiatop Infant e delle IgE totali utlizzando la tecnologia Immunocap (Pharmacia) in 76 bambini (41 maschi e 35 femmine) di età inferiore ai 12 anni (media: 5.7 +/- 3.4 anni) inviati al nostro centro con il sospetto clinico di patologia allergica. In un sottogruppo di questi costituito da 31 bambini (21 maschi e 10 femmine , di 5.6 +/- 2.5 anni) si è eseguito il nostro pannello pediatrico (costituito da 18 allergeni) per IgE specifiche (Pharmacia).

Risultati

Nei 76 bambini in cui è stato eseguito sia il Phadiatop infant che le IgE totali si sono evidenziati 31 bambini positivi al test con IgE totali >100 kU/l, 8 erano positivi al test con IgE totali < 100, 13 erano negativi con IgE totali > 100, 24 negativi al Phadiatop infant e con IgE totali < 100. Nel sottogruppo di 31 bambini abbiamo ottenuto 13 bambini positivi al Phadiatop infant con almeno un allergene positivo del pannello e IgE totali >100 kU/l, 3 presentavano Phadiatop infant positivo con pannello positivo per almeno un allergene e IgE totali < 100, 10 erano Phadiatop infant negativi , con pannello negativo e IgE totali <100, altri 3 bambini si presentavano con Phadiatop infant negativi, pannello allergologico negativo e IgE > 100, un bambino aveva il Phadiatop infant negativo e un allergene positivo con IgE >100 e un altro Phadiatop infant positivo con pannello negativo e IgE < 100.

Conclusioni

Per quanto riguarda il confronto del dosaggio Phadiatop infant con il dosaggio delle IgE totali si nota che questo nuovo test può indicare il sospetto di patologia allergica in bambini con IgE totali < 100 kU/l (8 bambini su 76) . Si dimostra quindi che questi due test hanno differenti indicazioni cliniche per il loro utilizzo nella patologia allergica . La parte più ristretta della casistica evidenzia la buona corrispondenza tra la positività del Phadiatop infant in presenza di almeno un allergene positivo e indipendentemente dai livelli di IgE totali , e la contemporanea negatività di Phadiatop infant e del dosaggio delle IgE specifiche del nostro pannello pediatrico.

D-07

CROSS-REATTIVITA' TRA DIVERSI TIPI DI PESCI IN BAMBINI ALLERGICI. CORRELAZIONE TRA PRICK CUTANEI E IGE SPECIFICHE

Palumbo Patrizia (a) Volterrani Anna (b) Cantacessa Luigina (c) Pompili Elio (d)

a) Laboratorio Analisi Ospedale San Giacomo Roma
b) Ambulatorio Allergologico Pedriatico "Nuovo Regina Margherita"
c) Tecnico Laboratorio Ospedale San Giacomo
d) Capo-Tecnico Laboratorio Ospedale San Giacomo

Scopo del lavoro

Lo studio ha esaminato la tolleranza dei pazienti risultati positivi all'immunocap f3 (merluzzo) nei confronti di altri pesci. L'indagine ha ricercato la presenza di anisakis simplex, nematode dell'ordine degli ascaridi, che parassita numerosi pesci di mare e cefalopodi permettendo di accertare sia quando i pazienti presentano l'allergia al pesce, sia la sensibilizzazione verso il parassita. L'allergia al pesce è tra le forme alimentari più diffuse, secondaria solo alle proteine del latte e dell'uovo, dipende dall'età considerata e dall'area geografica in cui diverse sono le abitudini alimentari. Infatti l'allergia al merluzzo è frequente dove è maggiore il consumo, per esempio in Svezia ne soffre circa il 39 % dei bambini, in Spagna il 18% .

Studi recenti hanno dimostrato che diverse componenti proteiche presenti in numerose specie di pesce, cross reagiscono con la proteine gad c1 del merluzzo. Ciò è stato dimostrato da uno studio sulla base dei risultati delle IgE specifiche eseguite sul siero di 16 bambini con storia positiva verso l'allergia al pesce in cui è evidente una elevata cross reattività tra gli antigeni del merluzzo, dentice, anguilla, branzino, è più bassa tra merluzzo, sogliola e tonno.

Materiale e metodi

Abbiamo esaminato 16 bambini con allergia al merluzzo; età compresa tra 4-14 anni.

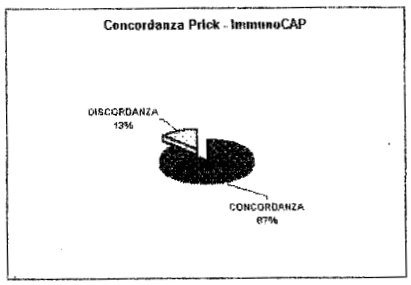
Abbiamo eseguito Prick by Prick con alimento fresco ed IgE specifiche (metodica immunocap della Pharmacia) per i seguenti pesci: merluzzo, sogliola, trota, salmone, tonno, gambero e calamaro.

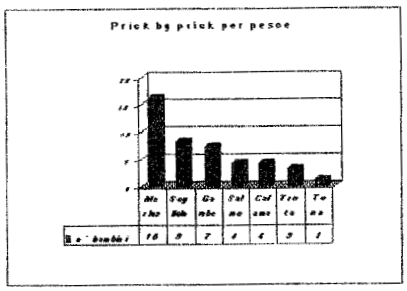
L'esame diagnostico in vitro prevede un primo livello di indagine in cui si valuteranno IgE totali nel siero, IgE specifiche verso immunocap f3, IgE specifiche verso immunocap p4 (anisakis simplex). Nel caso di positività verso f3 l'indagine proseguirà allargando la ricerca verso Ige specifiche di differenti allergeni di pesce.

Osservazioni: solo 3 su 16 bambini (18,7%) non ha presentato cross-reattività agli altri tipi di pesce sia al prick che all'immunocap . Il 37,5% dei bambini ha mostrato cross-reattività per più di due tipi di pesci. La concordanza prick-immunocap è risultata la più elevata per l'87% dei casi.

La sintomatologia prevalente è stata orticaria-angioedema e dolori addominali. Rare le manifestazioni respiratorie. L' 80% dei bambini positivi ai crostacei presentava sintomi all'ingestione dell'alimento; il 50% dei bambini positivi al salmone presentava sintomi all'ingestione di questo pesce. La correlazione dei singoli allergeni del pesce con il merluzzo è stata massima con la sogliola (50%).

Risultati





Discussione e conclusioni

E' stata posta particolare attenzione alla cross-reattività con le IgE specifiche (immunocap) e Prick cutanei tra i vari tipi di pesce in correlazione con la sintomatologia clinica presentata dai bambini. Dal nostro studio possiamo trarre le seguenti considerazioni : 1) nella quasi totalità dei bambini allergici al merluzzoc' è una reattività crociata con altri pesci non soltanto di specie affini, ma anche con i crostacei; 2) in un caso abbiamo riscontrato positività all'anisakis simplex e contemporaneamente al merluzzo e reattività crociata con altri pesci, in questo caso la sintomatologia non era presente per i pesci cross-reagenti; 3) risulta molto elevata la concordanza fra IgE specifiche e Prick test, cosa non sempre rilevata con gli alimenti, ma significativa nel caso dei pesci. Ciò conferma la validità di entrambi i test nell'allergia al pesce e la loro correlazione con la sintomatologia clinica.

D-08

PREVALENZA E SIGNIFICATO CLINICO DEGLI ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI NELLE CONNETTIVITI SISTEMICHE E NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI DELL'APPARATO GASTRO-ENTERICO

N. Bizzaro [1], D. Villalta [2], E. Tonutti [3], A. Doria [4], M. Tampoia [5], D. Bassetti [6], R. Tozzoli [7].

[1] Laboratorio di Patologia Clinica, S. Donà di Piave (VE); [2] Servizio di Immunologia, Pordenone; [3] Istituto di Chimica Clinica, Udine; [4] Divisione di Reumatologia, Università di Padova; [5] Patologia Clinica, Bari; [6] Patologia Clinica, Trento; [7] Laboratorio Analisi Chimico-cliniche, Latisana (UD).

L'identificazione dell'enzima transglutaminasi (tTG) quale principale antigene bersaglio degli autoanticorpi presenti nei soggetti affetti da malattia celiaca (MC), ha portato in breve tempo alla diffusione del test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione degli anticorpi anti-tTG che si è dimostrato molto sensibile e specifico per la diagnosi di MC. Tuttavia, non sono disponibili dati sulla prevalenza e sul significato clinico degli anticorpi anti-tTG nelle altre malattie autoimmuni.

Materiali e metodi

Sono stati studiati 618 pazienti affetti da connettivite sistemica o da malattia autoimmune dell'apparato gastroenterico [100 con lupus eritematoso sistemico (LES), 100 con sclerosi sistemica (SSc), 100 con sindrome di Sjögren (SS), 100 con artrite reumatoide (AR), 48 con cirrosi biliare primitiva (CBP), 100 con rettocolite ulcerosa (RCU), e 70 con morbo di Crohn]. 120 soggetti sani sono stati inclusi come gruppo di controllo. Gli anticorpi anti-tTG di classe IgA e IgG sono stati determinati con un metodo ELISA che impiega un antigene ricombinante umano (Eurospital, Trieste). Come valori di cut-off sono stati adottati quelli già validati in un ampio studio condotto precedentemente dal nostro gruppo, e cioè 7 unità arbitrarie (UA) per le IgA e 30 UA per le IgG. I campioni con valori di IgA o IgG superiori al cut-off, sono stati successivamente testati per gli anticorpi anti-endomisio (EMA) di classe IgA o IgG, utilizzando il metodo di immunofluorescenza indiretta su sezioni di esofago di primate (Eurospital). In presenza di un risultato positivo, il paziente è stato sottoposto a biopsia intestinale; se viceversa gli EMA erano negativi, è stata eseguita la ricerca degli alleli HLA DQA1*0501 e DQB1*02 (Protrans HLA Celiac Disease, Kesch, Germania), e i pazienti risultati positivi, sottoposti a biopsia.

Risultati

12 dei 618 pazienti studiati (1.9%) sono risultati anti-tTG positivi (5 IgA, 4 IgG, e in tre casi per entrambi gli anticorpi). Per quanto riguarda la malattia associata, gli anti-tTG sono risultati positivi in 3 pazienti con LES (1 IgA e 2 IgG), in 1 con AR (IgA), in 1 con SSc (IgA), in 1 con SS (IgG), in 5 con CBP (1 IgA, 1 IgG, e 3 sia IgA che IgG), e in 1 con RCU (IgA). Nessun soggetto con malattia di Crohn è risultato positivo. Solamente uno dei 120 soggetti sani (0.8%) presentava una debole positività per anti-tTG di classe IgA. La ricerca degli EMA IgA è risultata positiva in due pazienti: uno affetto da LES e uno da RCU; gli altri 10 pazienti e il soggetto sano sono risultati tutti negativi sia per gli EMA IgA che IgG. La determinazione degli alleli HLA DQA1*0501 e DQB1*02 in questi 10 pazienti, è risultata negativa. La biopsia intestinale effettuata nei due pazienti anti-tTG ed EMA positivi, ha evidenziato la presenza di atrofia dei villi, compatibile con la diagnosi di malattia celiaca.

Conclusioni

Nel presente studio comprendente pazienti con connettivite sistemica o con malattia autoimmune del tratto gastroenterico, la prevalenza di anti-tTG è risultata del 1.9%, ma quella di MC solo dello 0.3%. Se si escludono i pazienti con CBP, che hanno evidenziato un 10% di falsi positivi, la prevalenza nei soggetti affetti da patologia autoimmune è risultata uguale a quella rilevata nella popolazione sana (1% circa). I risultati di questo studio dimostrano che anticorpi anti-tTG possono essere presenti senza significato clinico in circa l'1-2% dei pazienti con malattia autoimmune, che nei pazienti affetti da CBP la probabilità di un risultato falso positivo è nettamente più elevata rispetto alle altre malattie autoimmuni, e che, comunque, la possibile associazione di un'altra malattia autoimmune con la MC deve sempre essere presa in considerazione ed esclusa.

D-09

VALUTAZIONE ANALITICA E CLINICA DEI DOSAGGI DI SECONDA GENERAZIONE PER LA DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI ANTI RECETTORE DEL TSH

D. Villalta[a], R.Tozzoli[b], E. Orunesu[c], P. Montagna[c], S.Stella[a], D. Corazza[a], N.Bizzaro[d], M. Bagnasco[c]

[a]Immunologia Clinica e Virologia, Az. Ospedaliera di Pordenone; [b]Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ospedale di Latisana; [c]Dipartimento di Medicina Interna, Allergologia e Immunologia clinica, Università di Genova; [d]Patologia Clinica, Ospedale di San Donà di Piave.

Scopo del lavoro

Scopo del lavoro è stata la valutazione delle performance analitiche e della accuratezza diagnostica di due nuovi test recettoriali di seconda generazione, utilizzanti recettore umano ricombinante, per il dosaggio degli autoanticorpi anti-recettore del TSH (h-TBII); il primo avente come tracciante lo ^{125}I (Dynotest TRAK human®), il secondo un estere dell' acridinio (Lumitest TRAK human®), entrambi prodotti dalla ditta BRHAMS, Berlino, Germania.

Pazienti e metodi

Sono stati sudiati 68 pazienti con morbo di Graves (GD): 19 con GD in fase attiva, non trattati (UTGD); 32 in trattamento con farmaci tireostatici (TGD); 6 in remissione clinica (CRGD); 11 con ricaduta dopo sospensione del trattamento farmacologico (RGD). Sono stati valutati, inoltre, 18 pazienti con tiroidite di Hashimoto (HT), 5 con mixedema idiopatico (IM) e 119 controlli sani (HC). I sieri , raccolti previo consenso informato da pazienti ambulatoriali afferenti al Dipartimento di Medicina Interna dell' Università di Genova, sono stati aliquotati e distribuiti ai quattro laboratori partecipanti allo studio. Due laboratori eseguirono i dosaggi con Dynotest TRAK human® e gli altri due con Lumitest TRAK human®. La precisione intra- laboratorio è stata valutata tramite rilevazione dei coefficienti di variazione (CV) di campioni a diversa concentrazione autoanticorpale.

Risultati

I CV inter-laboratorio per campioni con valori di 1, 2, 5, 20 e 40 IU/l risultarono, rispettivamente, 15.1%, 10.5%, 8.4%, 5.7% e 9.0%, per il Dynotest TRAK human® e 19.9%, 13.0%, 9.4%, 14.3% e 6.6% per il Lumitest TRAK human®, dimostrando una buona precisione per entrambi i test, anche se lievemente migliore per il test utilizzante il tracciante radiomarcato. Elevata è risultata la correlazione tra i due test (r^2, 0.9465; $p<0.0001$; slope, 1.017; intervallo di confidenza 95% (CI), 0.975 - 1.06; Y-intercetta, -0.868 – 0.163). In base alla analisi delle curve ROC, i punti di maggior discrimine per i cut-off risultarono essere 1.47 IU/l per il Dynotest TRAK human® e 1.69 IU/l per il Lumitest TRAK human®. Dal momento, però, che i CV per concentrazioni inferiori a 2 IU/l risultarono >15%, fu scelto di adottare come cut-off per entrambi i test il valore di 1.99 IU/l, al fine di limitare gli errori legati alla imprecisione analitica alle basse concentrazioni autoanticorpali. Con tale valore di cut-off entrambi i test evidenziarono una sensibilità clinica per gli UTGD del 100% e una specificità del 99.1% (solo 1 dei 119 HC risultò positivo con entrambi i metodi). Inoltre gli h-TBII furono positivi in 21/32 (65.6%) dei TGD, 2/6 (33.3%) dei CRGD, 11/11 (100%) dei RGD, 1/5 (20%) degli IM e 0/18 (0%) degli HT.

Discussione e Conclusioni

La buona precisione analitica inter-laboratorio e la ottima correlazione dei dati quantitativi ottenuti con i due test valutati facilita il monitoraggio dei pazienti con GD, rendendo possibile il paragone tra risultati ottenuti in laboratori diversi. E' stato possibile confermare la maggiore sensibilità e specificità, per la diagnosi di GD, dei test di seconda generazione, rispetto a quelle riportate per i test di prima generazione utilizzanti il recettore porcino. Nonostante sia risultato evidente il calo della positività autoanticorpale durante il trattamento e il seguente rialzo durante le recidive, da questo studio non può essere tratta alcuna conclusione circa il ruolo della misura degli h-TBII come parametro predittivo di recidiva del GD. Infine, il riscontro di positività in alcuni pazienti con IM conferma il possibile ruolo eziologico degli autoanticorpi anti-recettore del TSH di tipo bloccante nella genesi dell' ipotiroidismo.

D-10

DETERMINAZIONE IN CITOFLUORIMETRIA DEGLI ANTICORPI ANTI SACCHAROMYCES CEREVISIAE NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI

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

Scopo del lavoro

I tests immunoenzimatici, di recente introduzione, per la determinazione nel siero degli anticorpi anti saccharomyces cerevisiae (ASCA), utili per la diagnosi di malattie infiammatorie intestinali (IBD), sono ancora eccesivamente costosi, presentano tempi di esecuzione piuttosto lunghi e prevedono l' uso di strips differenti per le diverse classi di anticorpi (IgG, IgA, IgM).

Lo scopo del nostro lavoro e' di mettere a punto un metodo citofluorimetrico rapido e poco costoso e di facile esecuzione per la determinazione degli ASCA nel siero dei pazienti affetti da IBD.

Materiali e metodi

In tubi da CFM, a 100 μl di S.C. fissati in etanolo, alle concentrazione di $2x10^6$/ml si aggiungono rispettivamente 50 μl di siero di controllo negativo, siero di controllo positivo o siero dei pazienti da testare intero ed a varie diluizioni per la eventuale titolazione degli auto-ab anti S.C. Dopo un incubazione di 20 minuti e lavaggio con PBS si aggiungono 20 μl di antisiero anti globuline umane marcate con fluorocromi e si effettua un'altra incubazione di 20 minuti e un altro lavaggio con PBS; si risospende in 500 μl di PBS e si acquisiscono 20000 eventi al CFM e si valuta sia la % di S.C. fluorescenti che il canale medio di fluorescenza. E' possibile utilizzare nello stesso tubo anticorpi anti Fc dei vari isotipi delle Ig marcati con diversi fluorocromi ed eventuali antisieri anti catene leggere K e λ.

Con questo metodo abbiamo analizzato 10 sieri di soggetti affetti da morbo di Crohn, 15 di pazienti affetti da altre IBD (rettocolite ulcerosa , coliti aspecifiche, ecc) e 12 sieri di soggetti normali .

Risultati

La presenza di ASCA e' stata dimostrata in 7 pazienti affetti da morbo di Crohn e in 1 paziente affetto da R.C.U. , sia con metodo immunoenzimatico commerciale (Alifax s. p.a.), che con questo nuovo metodo in CFM, con una concordanza del 100%. L'uso degli antisieri K e λ ha permesso di evidenziare la presenza di una risposta clonale in 6 campioni positivi per ASCA.

Discussione e conclusioni

La determinazione degli ASCA in CFM presenta un ottima concordanza con i metodi commerciali; e' rapida, semplice, economica e permette di valutare sia l'isotipo che la clonalita' degli anticorpi presenti nelle IBD. La restrizione clonale osservata in 6/7 casi, suggerisce che la risposta autoimmune osservata nelle IBD e' dovuta all'espansione clonale di B linfociti che utilizzano combinazioni geneticamente ristrette ed altamente specifiche di prodotti di geni per le catene pesanti e leggere delle Ig; cio' potrebbe avere importanza per la patogenesi, la diagnosi e il trattamento delle IBD.

D-11

GLI AUTOANTICORPI ANTI-COFATTORI NELLE SINDROMI PRIMITIVE DA ANTICORPI ANTI-FOSFOLIPIDI

Antonia Dardano, Miranda Menniti, Salvatore Cimieri, Rosella Ierinò, Vera Fuduli

Cattedra ed U.O. di Patologia Clinica, DMSC, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi "Magna Græcia" Catanzaro.

Scopo del Lavoro

Le Sindromi da APS primitive, caratterizzate da aborti ricorrenti, o da trombosi arteriose e/o venose e da piastrinopenia, sono associate alla presenza di anticorpi antifosfolipidi. La diagnosi di queste sindromi viene sempre meglio definita grazie all'impiego di test di laboratorio, ad elevata specificità, per il dosaggio di anticorpi rivolti verso particolari cofattori. Tra questi sembrano assumere un ruolo significativo quelli anti-β2 glicoproteina I che, ad esempio, impedendo l'attivazione della proteina C, provocano una spiccata trombofilia e quelli prodotti nei confronti di differenti proteine della cascata coagulativa. In questo studio abbiamo voluto valutare se, un test di laboratorio di ultima generazione, nel quale i pozzetti della micropiastra sono attivati con Cardiolipina legata con β-2 GPI bovina, potesse consentire una significativa correlazione tra sintomatologia clinica e positività al test, sia in pazienti con TVP sia in quelli con Arteriopatie.

Materiali e Metodi

In questo studio sono stati arruolati 75 pazienti, preselezionati sulla base della diagnosi clinica di tromboembolismo venoso od arterioso. In tutti i pazienti sono stati dosati i parametri coagulativi di base aPTT, PT, ATIII, Fibrinogeno, D-Dimero e il sistema Proteina C-Proteina S (STA-C, Roche Diagnostic, Milano); gli autoanticorpi anticardiolipina (IgG ed IgM) utilizzando kit Varelisa (Pharmacia Diagnotics). Sono stati, inoltre, valutati 5 sieri a titolo noto, per il controllo di qualità esterno (UKNEQUAS).

Risultati

Dei 75 pazienti arruolati in questo studio, 58 erano sofferenti di TVP e 17 di arteriopatia centrale o periferica. Tra i pazienti venosi, 25 sono risultati negativi al dosaggio delle IgG anti ACL, 33 avevano valori al di sopra limiti di riferimento (>15 GPL-U/ml) di autoanticorpi ACL, di questi 17 sono stati classificati come fortemente positivi (>25 GPL-U/ml). Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti con il dosaggio delle IgM anti ACL. Nello stesso gruppo di pazienti, 16 sono risultati positivi alle IgG ed alle IgM; 9 sono risultati negativi alle IgG ed alle IgM.

Tra i pazienti con arteriopatie, 8 sono risultati negativi per le IgG, 9 positivi e di questi 5 erano fortemente positivi. In questo gruppo di pazienti, solo 3 erano negativi per le IgM, 14 i positivi e di questi 5 fortemente positivi. 1 paziente di questo gruppo è risultato negativo sia alle IgG sia alle IgM, 7 positivi ad entrambi i dosaggi.

I valori ottenuti con i controlli di qualità rientrano nell'ambito di quelli attesi.

Discussione e Conclusioni

I dati ottenuti con i sieri del CQ indicano l'elevata specificità, accuratezza e riproducibilità del dosaggio che, a nostro avviso, può essere impiegato per il corretto inquadramento patogenetico delle sindromi da APS, sia nei pazienti venosi sia in quelli arteriosi. I dati ottenuti dalla valutazione dei pazienti, suggeriscono una maggiore significatività del dosaggio delle IgM nei pazienti con arteriopatia ed una sostanziale corrispondenza dei dosaggi delle IgG e delle IgM nei pazienti con TVP.

D-12

ACCURATEZZA DIAGNOSTICA DEGLI ANTICORPI ANTI-SACCHAROMYCES CEREVISIAE (ASCA) E ANTI-CITOPLASMA PERINUCLEARE DEI NEUTROFILI (p-ANCA) NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI.

C.Bonaguri, L.Battistelli, A.Russo, E.Roncari, M.Ferrrari, C.Monica

Dipartimento Diagnostica Laboratorio,Laboratorio Analisi Emato-Chimiche,AziendaOsp.Parma

Scopo del Lavoro

La diagnostica delle Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (M.I.C.I.) è al momento caratterizzata da alcune problematiche consistenti essenzialmente in una sintomatologia iniziale spesso confondente e nel fatto che in una percentuale di pazienti affetti da M.I.C.I. (10-15%) non può essere posta con certezza una diagnosi differenziale fra Morbo di Crohn (M.C.) e Colite Ulcerosa (C.U.). Scopo dello studio è stato contribuire allo definizione del significato diagnostico nelle M.I.C.I. degli anticorpi anti-ASCA e anti p-ANCA considerati singolarmente o in associazione.

Materiali e Metodi

Lo studio ha preso in esame 113 pazienti i cui sieri sono afferiti consecutivamente al Laboratorio di Analisi Emato-Chimiche dell'Az.Osp. di Parma dal Febbraio 2001 al Febbraio 2002. I pazienti, in base ai criteri diagnostici standard, sono stati classificati come:M.C.(37),C.U.(32),C.I.(7) e non M.I.C.I.(37). Gli ASCA sono stati dosati con tests standardizzati in ELISA (MEDIPAN):gli ASCA IgA sono stati valutati quantitativamente (vn<20 UI/mL),mentre per gli ASCA IgG è stata utilizzata una valutazione qualitativa.La valutazione dei p-ANCA è stata realizzata in IFA su neutrofili fissati in etanolo (SCIMEDX).

Risultati

	ASCA IgA Valore medio(D.S.)	**%POS ASCA** (IgA e/o IgG)	**%POS p-ANCA**
M.C. (37)	33.8 (40.4)	68 (25/37)	19 (6/31)
C.U. (32)	8.8 (5.0)	3 (1/32)	57 (16/28)
C.I. (7)	11.5 (11.7)	28 (2/7)	20 (1/5)
Non M.I.C.I. (37)	7.6 (27.3)	3 (1/37)	3 (1/37)

ASCA: M.C. vs C.U. p<0.01 ; M.C. vs Non M.I.C.I. p<0.001
p-ANCA : M.C. vs C.U. p<0.05 ; C.U. vs Non M.I.C.I. p<0.001

Discussione e Conclusioni

Dai dati riportati si evidenzia come i livelli medi di ASCA IgA appaiono significativamente più elevati nel M.C.rispetto ai Controlli (33.8 vs 7.6, p<0.01)e alla C.U.(8.8, p<0.001); riguardo ai p-ANCA,la loro espressione è risultata ,come riportato in letteratura (Rutgerts P. et al.,Lancet 2000 vol 356) strettamente associata alla C.U.rispetto al M.C.(57%vs19%,p<0.05) e ai Controlli (3%,p<0.001), confermando, comunque, valori di sensibilità non elevati e inferiori agli ASCA nella diagnosi di M.I.C.I.(57% vs 68%).Questi dati ,a nostro avviso, supportano la validità di questi markers nella diagnosi differenziale M.C. vs C.U.e suggeriscono di valutare un loro utilizzo combinato nello screening per M.I.C.I.

D-13

Conteggio assoluto dei linfociti CD4+: full technology versus minimal technology

M. Carta, S. Indico, L. Forner, D. Giavarina, G. Soffiati
Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia
Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

INTRODUZIONE: A tutt'oggi la conta assoluta dei linfociti T CD4+ rimane il principale parametro di laboratorio, abbinato alla carica virale, per stadiare un paziente HIV infetto. Il conteggio dei linfociti CD4+, oltre che per la diagnosi è anche fondamentale nella valutazione delle infezioni opportunistiche, nel suggerire terapie preventive, per documentare l'effetto di terapie antiretrovirali o con citochine. In particolare il valore assoluto di CD4 continua ad essere il miglior indice predittivo del subentrare di una infezione opportunistica.
Il conteggio dei CD4 viene utilizzato anche in situazioni diverse dall'HIV, come ad esempio negli individui trapiantati. Fino a poco tempo fa il conteggio dei CD4 veniva fatto con la tecnica a doppia piattaforma comprendente quindi una prima analisi al citofluorimetro per determinare la percentuale di linfociti CD4 e un ulteriore processo al contaglobuli per calcolare il numero di globuli bianchi e linfociti. L'utilizzo di due strumenti limitava però la precisione analitica del dato in particolare perché si basava sull'assunto che i criteri che definiscono la popolazione linfocitaria fossero i medesimi nei due strumenti. Per questo le principali società stanno spingendo verso l'adozione delle tecniche a piattaforma singola in cui le cellule CD4 vengono misurate direttamente al citofluorimetro in un preciso volume di sangue. In questo caso non è necessario cercare una popolazione di riferimento, ma solo isolare correttamente le cellule CD4 dalla altre "contaminanti". Con la tecnica a doppia piattaforma è necessario definire correttamente la popolazione linfocitaria cercata, utilizzando oltre ai parametri fisici (light scatter) anche parametri immunologici (CD45, CD3). L'approccio più utilizzato è quello che si basa su una quadrupla combinazione di anticorpi CD45, CD3, CD4 e CD8. Secondo alcune osservazioni preliminari tuttavia con l'adozione della tecnica a piattaforma singola questa combinazione potrebbe essere ridondante e potrebbe essere sufficiente l'adozione di un singolo anticorpo CD4. Abbiamo allora analizzato nel nostro laboratorio se l'adozione di una combinazione anticorpale limitata (minimal technology) è effettivamente sovrapponibile ai risultati ottenuto con la combinazione tradizionale (full technology).

MATERIALI E METODI: Abbiamo analizzato su citofluorimetro Coulter XL (Instrumentation Laboratory, Milano, I) 100 campioni provenienti dalla nostra routine (prevalentemente HIV+) calcolando i linfociti CD4+ con la tecnica a singola piattaforma (Flow Count Fluorospheres, Beckman Coulter, F), ma utilizzando contemporaneamente sia la combinazione CD45 FITC, CD4 RDI, CD3PC5, CD8 ECD (Beckman, Coulter) che l'anticorpo singolo marcato CD4 PE (Immunotech, Coulter C., F). Inoltre i campioni marcati con la quadrupla sono anche stati letti escludendo le altre marcature sulla base del solo CD4PE.

RISULTATI: Il confronto tra i linfociti CD4+ calcolati con la quadrupla marcatura e ricalcolati sullo stesso campione utilizzando un nuovo protocollo di lettura che escluda le altre marcature considerando solo l'anticorpo CD4 RDI, ha verificato la correlazione tra i due metodi con una lieve sottostima delle cellule CD4 calcolate in singolo pari circa a 1.8% (limiti di concordanza da -11,6% a + 15,2%) Se però il campione viene invece processato indipendentemente utilizzando un singolo anticorpo monoclonale CD4 PE, il bias è pari a 14.6%, (--13.8% a + 43,0%).

DISCUSSIONE: L'utilizzo di più marcatori fisici e immunologici consente teoricamente di selezionare in maniera accurata la popolazione linfocitaria CD4+. La nuova tecnologia a piattaforma singola si basa però su diversi criteri che non richiedono come avveniva invece per le tecniche tradizionali, una messa a punto precisa del gate linfocitario, ma si basano sull'identificazione delle cellule CD4+, isolandole dalle cellule "contaminanti". Per questo motivo, mentre le nuove linee guida sono senz'altro unanimi nel raccomandare l'utilizzo della tecnica a piattaforma singola, ancora si discute se è necessario utilizzare più marcatori immunologici o se questi possono essere ridotti. Il nostro studio sembra evidenziare come i risultati siano abbastanza sovrapponibili se il campione viene semplicemente letto con protocolli che escludano fluorescenze aggiuntive , ma i risultati sono diversi se invece il campione viene trattato indipendentemente. Le metodologie testate sono recenti e quindi non è ancora chiaro se le cellule CD4 lette in questo modo debbano essere considerate "diverse" dai CD4 ottenuti in maniera tradizionale. Ancora non è stato possibile dimostrare quale sia l'effettivo impatto di una possibile variazione del numero di Cd4 pari appunto al 10-15% sul follow up del paziente HIV. E' quindi a nostro avviso necessario attendere sperimentazione più ampie e corredate anche da un approccio pratico al paziente, prima di scegliere nuove metodiche che, sicuramente vantaggiose dal punto di vista economico, non convincono però ancora sul versante accuratezza e confrontabilità del risultato.

D-14

SEMPLIFICAZIONE DEL METODO PER LA VALUTAZIONE DEI LINFOCITI T "HELPER/INDUCER" CD3+ CD4+ "NAIVE" (CD45RA) E "MEMORY" (CD45RO) MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO

G. De Soccio, M. Lio, M. Cenci, O. Recchia

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Presidio Addolorata, Complesso Ospedaliero Azienda Ospedaliera S. Giovanni Addolorata, Roma

Scopo del lavoro

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di semplificare e migliorare il metodo per la valutazione dei linfociti T "helper/inducer" CD3+ CD4+ "naive" (CD45RA) e CD3+ CD4+ "memory" (CD45RO), analisi effettuata mediante citofluorimetria a flusso.

Materiali e Metodi

Nel nostro laboratorio l'analisi dei linfociti T "helper/inducer" CD3+ CD4+ "naive" e "memory" è stata introdotta nel 1997 principalmente nel follow-up di pazienti affetti dall'HIV (Human Immunodeficiency Virus). Tale valutazione viene effettuata mediante citofluorimetro a flusso FACSCalibur (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, Inc., San Jose, CA, USA) utilizzando reagenti a quattro colori. La metodica iniziale, mantenuta fino a giugno del 2002, prevedeva l'utilizzo di una procedura completamente manuale di lisi e lavaggio con quattro anticorpi monoclonali (CD62L/Leu8-PE, CD45RA-FITC, CD4-PerCP e CD3-APC per i linfociti "naive" e CD62L/Leu8-FITC, CD45RO-PE, CD4-PerCP e CD43-APC per i linfociti "memory") (Becton Dickinson) a colore singolo, miscelati manualmente al sangue intero del paziente. L'acquisizione manuale si effettuava utilizzando il software CELLQuest e l'analisi mediante software Paint-a-gate. Tale analisi valutava i linfociti T "helper/inducer" "naive" CD3+ CD4+ CD45RA+ CD62L+ e T "helper/inducer" "memory" CD3+ CD4+ CD45RO+ CD62L-.

La procedura attualmente utilizzata prevede: 1) reagenti a quattro colori già miscelati dalla ditta produttrice (anticorpo monoclonale CD45RA 62L/3/4 che include CD45RA-FITC, CD62 L PE, CD3-PerCP e CD4-APC) (Becton Dickinson); 2) preparazione dei campioni completamente automatica mediante il preparatore automatico SP-1 (BD FACS Sample Processor, Becton Dickinson); 3) utilizzo di una metodica di lisi senza lavaggio; 4) acquisizione automatica mediante software FACS Loader; 5) analisi mediante software Paint-a-gate. Tale analisi valuta i linfociti T "helper/inducer" "naive" CD3+ CD4+ CD45RA+ CD62L+ e T "helper/inducer" "memory" CD3+ CD4+ CD45RA- CD62L-.

	n. tubi	Monoclonali	Allestimento	Acquisizione	Analisi
Metodo iniziale lisi e lavaggio	2	4 reagenti a colore singolo	manuale 45 minuti	manuale CellQuest	software Paint-a-gate
Metodo attuale lisi senza lavaggio	1	1 reagente a 4 colori	automatico 30 minuti	automatica FACS Loader	software Paint-a-gate

Discussione e Conclusioni

La valutazione quantitativa dei linfociti T "helper/inducer" CD3+ CD4+ "naive" e "memory" è utile nel follow-up di diverse malattie, dalle patologie autoimmuni alle infezioni virali: nel nostro laboratorio viene richiesta principalmente per i malati affetti dall'HIV. Tale valutazione può essere effettuata mediante citofluorimetria a flusso in modo ottimale ma con metodi che possono essere lunghi e laboriosi. La metodica da noi introdotta attualmente permette di semplificare tale analisi in quanto riduce il tempo necessario per l'allestimento e l'acquisizione, riduce i costi poiché prevede l'utilizzo di un solo reagente e abbassa notevolmente il possibile rischio biologico di contagio mediante il campionamento automatico del sangue intero.

D-15

MARCATORI SIEROLOGICI (ASCA e ANCA) NELLE IBD: PROPOSTA DI UN PROTOCOLLO DIAGNOSTICO CON KIT DEL COMMERCIO

E. Mainardi, A.Vagni, L. Cresci, MT. Romagnoli, A. Montanelli
Dipartimento di Patologia clinica, A.O. Ospedale Maggiore di Crema

Scopo

Sono oggi disponibili due markers sierologici: ANCA (anticorpi anti citoplasma dei neutrofili) ed ASCA (anticorpi anti Saccharomyces Cerevisiae) ritenuti in grado di supportare e completare l'iter diagnostico delle IBD (Retto colite ulcerosa: UC e Malattia di Crohn: CD). Mediante uno studio controllato in doppio cieco si vuol esprimere una valutazione delle performances analitiche (sensibilità, specificità) ottenute con kits commerciali ed elaborare un protocollo di laboratorio che con procedura step by step garantisca la migliore accuratezza diagnostica, unitamente alla praticabilità e razionalizzazione dei costi.

Materiali e metodi

Su 100 pazienti sottoposti a colonscopia per sospetto clinico di IBD è stato applicato uno studio in doppio cieco che ha previsto: indagine istopatologica secondo procedure standard sui campioni bioptici di mucosa intestinale e determinazione dei marcatori sierologici ANCA ed ASCA con diversi kits del commercio: Antibodies against granulocytes (c-ANCA, p-ANCA) – EUROIMMUN, GmbH; ANCA combi – ORG 530 – ORGENTEC Diagnostica, GmbH (BOUTY); Antibodies against Saccharomyces cerevisiae – EUROIMMUN, GmbH; ASCA IgG e IgA ELISA kit – Genesis Diagnostics Ltd, UK (BOUTY).

Risultati

	SENSIBILITA'	SPECIFICITA'	VPP	VPN	ACCURATEZZA COMPLESSIVA	Costo/determ. da listino
IFI - ASCA IgA o IgG	86%	67%	42%	94%	71%	4.3 €
ELISA – ASCA IgA o IgG	86%	81%	56%	91%	82%	7 €
IFI – ANCA IgG	71%	90%	77%	89%	85%	7.7 €
ELISA – ANCA IgG Profile	74%	91%	79%	89%	87%	60 €

Discussione e conclusioni

La nostra esperienza consente di riaffermare che: la combinazione ASCA+/ANCA– nella diagnosi di CD è in grado di esprimere una sensibilità pari all' 82% ed una specificità pari al 93%; mentre la combinazione ASCA-/ANCA+ nella diagnosi di UC è in grado di esprimere una sensibilità pari al 68% ed una specificità pari al 100%.

Questi risultati ottimali possono essere garantiti sulla base del seguente protocollo diagnostico di laboratorio:

1° STEP (elevata sensibilità)
ASCA: ricerca con metodologia ad immunofluorescenza (Euroimmun)
ANCA: ricerca con metodologia ad immunofluorescenza (Euroimmun)
2° STEP (elevata specificità)
ASCA: conferma con metodologia in ELISA (Bouty)
ANCA: conferma con metodologia in ELISA (singoli antigeni – Bouty).

Gli ottimi risultati candidano questi marcatori sierologici ad un sicuro ruolo diagnostico, in particolare in alcune situazioni specifiche. Grazie alla non-invasività possono essere proposti nello screening di popolazioni selezionate (in particolar modo soggetti di età pediatrica) e grazie all'elevatissima specificità quale supporto diagnostico nei casi in cui la diagnosi clinico-istopatologica rimane indeterminata o dubbia (a tutt'oggi stimabile pari al 10%: coliti indeterminate).

D-16

Utilità di uno screening prevaccinale per il dosaggio degli anticorpi anti tetano con metodo immunoenzimatico automatizzato

I.Bianco[1], F. Cappella[1], A.Di Paolo[2], C.Ucci[1]
[1]Lab.Analisi-Microbiologia Osp.Civile "Renzetti", Lanciano (CH) [2]Medico competente, Lanciano(CH)

Scopo del lavoro

Il tetano è una grave malattia infettiva, in molti casi mortale causata dall'azione della tossina tetanica prodotta dal Clostridium tetani presente nel suolo o nell'intestino degli animali. L'infezione deriva spesso da una ferita, anche banale, occorsa ad una persona non vaccinata o che non abbia adeguatamente completato il programma di vaccinazione.La normativa sulla vaccinazione antitetanica comprende la Legge del 5 marzo 1963, n° 292 che ha reso obbligatoria la vaccinazione per alcune categorie di lavoratori; la vaccinazione obbligatoria effettuata a tutti i militari dal 1931 in Italia; la legge n° 419 del 20 marzo 1968 che prevede l'obbligatorietà della vaccinazione per tutti i bambini entro il 2° anno di vita. Scopo del nostro lavoro è proporre, nelle categorie a rischio e soggette per legge a vaccinazione, il dosaggio periodico degli anticorpi nei confronti del tetano, come metodo più economico ed efficace per individuare i soggetti immunologicamente non protetti o parzialmente protetti da sottoporre a vaccinazione.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati, per il dosaggio di anticorpi IgG contro il tetano, 149 sieri di lavoratori maschi, di età compresa tra i 20 e i 56 anni, impiegati in uno stabilimento siderurgico che dovevano essere sottoposti a vaccinazione per il tetano. Abbiamo utilizzato un test immunoenzimatico della Drg diagnostics distribuito dalla Bouty Italia, automatizzato sullo strumento DSX della ditta stessa, con un tempo complessivo di esecuzione stimato in circa 120 minuti.

Risultati

I risultati sono espressi come titolo anticorpale in Unita Internazionali/ml ed interpretati come di seguito:

- Titoli < 0.5 non assicurano protezione immunologica
- Titoli tra 0,5 e 0,9 IU/ml il titolo assicurano protezione immunologica.Controllo dopo 1-2 anni.
- Titoli tra 1,0 e 5.0 IU/ml assicurano protezione immunologica.Controllo dopo 2-4 anni.
- Titoli >5,0 IU/ml assicurano protezione immunologica Controllo dopo 4-8 anni.

Dall'analisi dei dati, 58 lavoratori (39 %) sono risultati non protetti con un titolo <0,5 IU/ml. anche se sicuramente vaccinati o per aver svolto il servizio militare o perché nati dopo il 1970; 91 lavoratori, pari al 61% sono risultati protetti, tra questi 19 (31 %) avevano un titolo compreso tra 0,5 e 0.9 IU/ml; 64 (43 %) un titolo compreso tra 1,0 e 5,0 IU/ml e 8 (5 %) un titolo >5,0 IU/ml.

Discussioni e conclusioni

Nel 61% dei lavoratori, risultati protetti dal tetano, sono stati evitati vaccinazioni e/o richiami, riservati invece al 39% dei lavoratori risultati non protetti.

La nostra proposta di screening prevaccinale prevede, a costi ridotti, di determinare con precisione lo stato di protezione dall'infezione tetanica, evitando il ricorso ad interventi più onerosi come la vaccinazione, in molti casi non necessaria. Il test Eia utilizzato per il nostro screening prevaccinale si è dimostrato relativamente semplice come esecuzione, rapido, e di costo contenuto.

E' preferibile quindi, a nostro parere, determinare il livello di protezione antitetanico ad intervalli regolari, mediante titolazione delle IgG specifiche, invece che procedere automaticamente alle pratiche vaccinali nelle categorie di lavoratori previste dalla legge.La conoscenza del proprio titolo anticorpale può evitare inoltre in occasione di traumi, la somministrazione di immunoglobuline specifiche umane.

Bibliografia

- Circolare n° 16 del Ministero della Sanità: *Tetano: misure di profilassi.* 11 novembre 1996.Available online at www.sanita.it/malinf/normativ/indice.htm
- Epidemiologia e prevenzione delle malattie prevenibili mediante la vaccinazione.Available online at www.cdc.gov/nip/publications/pink/tetanus.pdf

D-17

VALORE DIAGNOSTICO DELLA DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-PEPTIDE CICLICO CITRULLINATO NELL'ARTRITE REUMATOIDE:CONFRONTO CON IL FATTORE REUMATOIDE.

M. Tampoia[1], F. Iannone[2], A. Fontana[1] , P. Maggiolini[1], A. Capozzo[1] , R. Genco[1] , N. Pansini[1]
[1] Laboratorio di Patologia Clinica I, Policlinico di Bari. ,[2] Dipartimento di Reumatologia, Università degli Studi di Bari.

Scopo del lavoro

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'accuratezza diagnostica del nuovo kit ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato di II generazione (anti-CCP-II Shield) nella diagnosi dell'artrite reumatoide (AR).

Pazienti e metodi

Abbiamo studiato 123 sieri : 83 provenienti da pazienti affetti da AR (42 femmine e 12 maschi, di età media 45, range 20-68), diagnosticati secondo i criteri dell'American College of Rheumatology (ACR) e 40 da soggetti sani (32 femmine e 8 maschi). In tutti i sieri sono stati ricercati gli anticorpi anti-CCP con kit ELISA di I e II generazione e il fattore reumatoide con metodica nefelometrica.

Risultati

Dei sieri di pazienti affetti da AR, 56 sono risultati positivi al test di II generazione e 40 al test di I generazione; nessuno dei soggetti normali ha presentato positività per gli anticorpi anti-CCP. Pertanto i valori di sensibilità e specificità per i due metodi considerati sono stati rispettivamente di: 67% e 100 %, 48% e 100 %. Il FR, invece, è risultato positivo in 53 (63.8 %) sieri di pazienti affetti da AR e in 5 (12..5 %) soggetti normali , con valori di sensibilità e specificità rispettivamente del 64 % e del 87 5%. Inoltre, nei pazienti affetti da AR, che presentavano positività per il FR gli anticorpi anti-CCP sono risultati positivi nel 40.9% dei casi ($p < 0.0002$) con la metodica di I generazione e nel 56.6 % dei casi ($p < 0.0002$) con la metodica di II generazione.

Conclusioni

I nostri dati suggeriscono che la ricerca degli anticorpi anti-CCP, rappresenta uno strumento utile per la diagnosi di AR. I dati, ottenuti utilizzando il test di I generazione , confermano quelli della letteratura.Il perfezionamento delle tecniche di sintesi polipeptidica adottato nei test di II generazione ha portato ad un miglioramento dell'accuratezza diagnostica sia in termini di sensibilità che specificità. Studi futuri dovranno meglio definirne l'utilità diagnostica, anche in funzione di specifici parametri clinici e strumentali.

D-18

PREVALENZA DEGLI AUTOANTICORPI ORGANO E NON-ORGANO SPECIFICI IN BAMBINI AFFETTI DA MORBO CELIACO.

M. Tampoia[1], R. Francavilla[2], M. Colecchia[1], P. F Agostini[1] M. Petrelli[1] , N. Pansini[1]
[1]Laboratorio di Patologia Clinica I, Policlinico di Bari. [2] Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Bari.

Scopo: determinare la prevalenza degli autoanticorpi organospecifici e non-organospecifici in bambini affetti da malattia celiaca e valutare se la loro presenza è: correlata con il tempo di esposizione al glutine e predittiva di patologia autoimmune o solo un epifenomeno.

Pazienti e metodi: tra il gennaio 1997 ed il marzo 2001 sono stati arruolati 350 bambini con morbo celiaco [204 F (58,2%); età media 3,1 anni (18 mesi – 16,5 anni)]. All'ingresso, 131 bambini (37,5%) assumevano una dieta contenente glutine, mentre 219 (62.5%) erano già in dieta libera da glutine, da un periodo di tempo medio di 3.2 anni (range: 6.2 mesi - 6 anni). 141 bambini (40,2%) presentavano una classica sindrome da malassorbimento, caratterizzata da diarrea e deficit di accrescimento, mentre 209 (59,8%) avevano sintomi cronici soprattutto da anemia ferro carenziale. Tutti i sieri dei pazienti sono stati testati per la ricerca di autoanticorpi anti-nucleo (ANA), anti mitocondrio (AMA), anti-muscolo liscio (ASMA), anti tireoperossidasi (TPO), anti-liver kidney microsomi (LKM), anti cellule parietali gastriche (APCA), anti reticulina (ARA), anti cardiolipina (ACA in 158 bambini) e anti-β_2 glicoproteina-1 (anti-β_2GP1 158 bambini). In presenza di un titolo ANA superiore a 1:160, i sieri sono stati successivamente testati per autoanticorpi anti-double-stranded DNA (dsDNA)e anti-antigeni nucleari estraibili (ENA)). I dosaggi di Ab-anti- TPO sono stati eseguiti con metodica in chemiluminescenza (ByK Golden), quelli di ACA e anti-β_2 GP1 con ELISA (Bouty) mentre gli altri autoanticorpi con metodica di immunofluorescenza indiretta (Euroimmune).

Risultati: 113 dei 350 bambini celiaci [32,2%; 71 F; età media 4.2 anni (range: 18 mesi – 14.2 anni); Gruppo I] sono risultati positivi per almeno un autoanticorpo, mentre i rimanenti 237 [67,8%; 133 F; età media età 3,3 anni (range: 19 mesi– 16,5 anni); Groppo II] sono risultati negativi. I due gruppi non differivano per durata di esposizione al glutine, sesso, presenza di glutine nella dieta, modalità di presentazione e severità dell'atrofia dei villi. 72 bambini erano positivi per ANA (21,1%), 14 per uno o entrambi ACA e anti- β_2GP1 (8,8%), 23 per ARA (6,5%), 12 per ASMA (3,4%), 5 per anti-TPO (1,6%), 3 per AMA (0.8%) e uno per anti-KLM . Nessuno dei 58 pazienti con titolo ANA superiore a 1:160 è risultato positivo per anti-dsDNA e anti- ENA. 21 bambini (6%) sono risultati positivi per più di un autoanticorpo (ANA/ARA and ACA/ antiβ_2GP1 in 7; ANA/ASMA in 3; TPO/LKM, ANA/TPO, ANA/ACA in uno rispettivamente). Non abbiamo riscontrato correlazioni tra il titolo di autoanticorpi e l'eta al momento della diagnosi, modalità di presentazione e presenza di glutine nella dieta. Una patologia autoimmune è stata diagnosticata in 8 bambini: tireopatia autoimmune in 5, epatite autoimmune tipo I in 2 e disordine autoimmune multiplo in uno (epatite autoimmune di tipo I + tiroidite autoimmune).L'età al momento della diagnosi in questi 8 bambini era significativamente più alta che negli altri (7,7 anni vs. 3.1 anni; $p<0.01$). La presenza di autoanticorpi organo specifici più che non-organo specifici predice una patologia autoimmune ($p<0,002$).

Conclusioni: il siero di pazienti celiaci è reattivo verso molti autoanticorpi in almeno un terzo dei casi. Eccetto per gli autoanticorpi organo specifici , la produzione di autoanticorpi non organo specifici è più verosimilmente un epifenomeno.La durata di esposizione al glutine non è correlata con la presenza di questi autoanticorpi in pazienti celiaci senza alcuna evidenza clinica di patologia autoimmune

D-19

INCIDENZA DI COMPONENTI MONOCLONALI IN PAZIENTI AFFETTI DA HCV

Pardini E., Landi N., Batini I., Telese D., Mantellassi B., Pellegrini G..

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Presidio Ospedaliero Cisanello, Via Paradisa n.2 56124 Pisa.

Scopo della ricerca

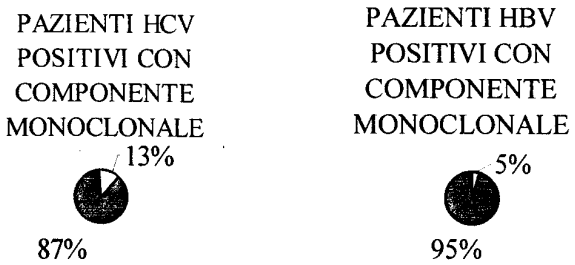
Scopo di questo lavoro è verificare la correlazione tra pazienti con epatite cronica da HCV e comparsa di componenti monoclonali.
Sono stati utilizzati come controllo negativo pazienti affetti da Epatite cronica B.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati 50 sieri di pazienti :
HCV positivi (30 casi)
HBV positivi (20 controlli)
Il metodo utilizzato per la ricerca delle componenti monoclonali è Hydragel 4 IF (SEBIA) che permette l'identificazione di proteine monoclonali mediante elettroforesi e successiva immunofissazione con antisieri specifici.
Il fattore reumatoide è stato dosato con metodica nefelometrica.(BNA II DADE)

Risultati

Su 30 campioni HCV positivi testati 4 hanno presentato componenti monoclonali, mentre nei controlli (HBV +) solo in un paziente è stata evidenziata una componente monoclonale.



Discussione e Conclusioni

Dato il basso numero di pazienti fino ad ora valutati, il campione di popolazione preso in considerazione (HCV+) non mostra ancora (come documentato dalla letteratura) una differenza statisticamente significativa per la presenza di componenti monoclonali rispetto al gruppo di controllo (HBV+).
Lo studio verrà proseguito con arruolamento di nuovi pazienti HCV + per maggiori approfondimenti.

1.G.P. Merlini, I. Zorzoli, E. Anesi, V. Perfetti, G. Marinane: Immunochemical characterization of the cryoglobulin; phatophysilogic implication. Clin Exp Rheumatol 1995; 13 (suppl.13):71-3.
2.J.C. Brouet, J.P. clauvel, F. Danon et al.: Biological and clinical significance of cryoglobulins. Am J. Med 1974; 57: 775-88.

D-20

AUTOANTIGENI NUCLEARI E APOPTOSI CELLULARE

C.Alpini ,S.Valaperta* ,S.Avalle* ,C.Soldani° ,M.Lotzniker**,R.Moratti* .*
**Laboratorio Analisi Chimico Cliniche IRCCS Policlinico San Matteo PAVIA*
***Azienda ospedaliera "Ospedale civile di Legnano"Laboratorio Analisi*
°Dipartimento di Biologia Animale Universita' degli Studi di Pavia

Scopo del lavoro

La presentazione di antigeni segregati all'interno del nucleo sulla superficie delle cellule apoptotiche, è ipotizzato come possibile innesco per la generazione di autoanticorpi in presenza di clearance apoptotica difettiva. La risposta immune puo' essere diretta sia verso antigeni integri che verso prodotti di degradazione dell'antigene nativo ad opera delle caspasi o di altri sistemi proteolitici. Nel presente studio,in vitro, sieri monospecifici di pazienti sono stati utilizzati per studiare il comportamento degli autoantigeni Fibrillarina e Sm durante l'apoptosi indotta.

Materiali e metodi

Gli esperimenti sono stati condotti su colture di cellule epiteliali Hep-2 derivanti da carcinoma laringeo umano, prima e dopo trattamento apoptogeno con Actinomicina D, inibitore specifico della polimerasi I. La percentuale di cellule apoptotiche e' stata valutata con tecniche morfologiche (microscopia ottica ed elettronica) e citochimiche (procedure TUNEL, colorazione sopravitale con annexinaV-FITC e ioduro di propidio).
Per l'analisi immunoistochimica dei sieri monospecifici selezionati , le cellule sono state fatte crescere su vetrino. Per la localizzazione dei diversi antigeni sono stati utilizzati anticorpi secondari anti IgG di uomo, coniugati con fluoresceina (FITC). I preparati sono stati osservati e fotografati con un microscopio a fluorescenza Olympus BX50 equipaggiato con opportuni filtri e con macchina fotografica digitale Camedia C2000 ZOOM.
In parallelo, estratti cellulari di Hep-2 prima e dopo trattamento sono stati fatti migrare su gel di poliacrilamide al 12%, trasferiti su nitrocellulosa mediante elettroblotting e sottoposti ad immunoreazione con i sieri monospecifici selezionati; l'immunocomplesso e' stato rivelato mediante tecnica ECL.

Risultati e Discussione

L'antigene nucleolare Fibrillarina e quello nucleare Sm non subiscono in corso di apoptosi clivaggio proteolitico .
Durante l'apoptosi, in parallelo con la condensazione della cromatina, sia la fibrillarina che l'antigene Sm fuoriescono dal nucleo nel citoplasma e si ritrovano, in forma immunocitochimicamente rilevabile,all'interno dei corpi apoptotici.In vivo, sempre attraverso il coinvolgimento della via apoptotica, sono stati descritti diversi fenomeni biologici che potrebbero concorrere alla generazione anticorpale nella sclerodermia quali l' iperespressione genica degli antigeni in oggetto recentemente descritta nei fibroblasti di pazienti sclerodermici o una diversa frammentazione degli antigeni in corso di apoptosi dovuta a legame con metalli pesanti, presenti come tossici esogeni.
La presentazione di antigeni alla superficie della cellula apoptotica non e' di per se' sufficiente per il superamento della tolleranza del self ma si rende necessario considerare anche le forme molecolari prodotte, il tipo di cellula che presenta l'antigene e l'efficienza della clerance e della degradazione del materiale apoptotico stesso. Il modello sperimentale approntato offre buone caratteristiche di riproducibilita' e risoluzione e puo' pertanto essere proposto come generale metodo di studio del destino apoptotico di tutti gli autoantigeni di interesse diagnostico.

D-21

RICERCA SANGUE OCCULTO: COMPARAZIONE FRA METODI IMMUNOCHIMICI

AUTORE: M. Colpo; B. Vachel, E. Trabuio, V. Miconi
ISTITUZIONE: Laboratorio di Analisi chimico-cliniche e microbiologiche
Ospedale San Lorenzo Valdagno (VI)

INTRODUZIONE:

Il test per la ricerca del sangue occulto sulle feci è ancora uno dei più sensibili esami di laboratorio per lo screening dell'emorragie gastrointestinali in caso di tumori, polipi, coliti e morbo di crohn.
Numerose sono le offerte commerciali dei kit per la ricerca dell'emoglobina fecale che si basano principalmente: sul metodo guaiaco, che sfrutta la capacità perossidasi simile dell'emoglobina di ossidare un materiale cromogenico in presenza di perossido d'idrogeno e sul sistema immunochimico che sfrutta la capacità degli anticorpi monoclonali e policlonali di legarsi all'emoglobina fecale. Nel nostro studio abbiamo comparato n. 2 sistemi immunochimici: l'OC-LIGHT e il NEW FOBY, che entrambi usano il metodo anticorpale ma con un diverso sistema di rilevazione del risultato.

MATERIALI E METODI:

Abbiamo comparato i sistemi su n°100 campioni di feci pervenute al nostro laboratorio per la ricerca del sangue occulto. I metodi usati sono: l'OC-LIGHT della Ditta Alfa Wassermann che è un test immunocromatografico con lettura del risultato su strip; il NEW FOBY della Ditta Biosigma che si avvale di una combinazione d'anticorpi e coniugato gold-colloidale con lettura del risultato su card. I test sono stati preparati ed interpretati da due operatori tecnici diversi e i risultati sono stati comparati a sperimentazione finita.

RISULTATI:

I risultati in percentuale su n°100 campioni

	Positivo	Negativo	Dubbio
NEW FOBY	4 %	91 %	5 %
OC-LIGHT	6%	93 %	1 %

DISCUSSIONE:

Il test per la ricerca del sangue occulto su feci è penalizzato da una scarsa ripetibilità per la quantità variabile dell'emoglobina presente nelle feci, soprattutto in caso di microemorragie e da una variabile analitica dovuta all'impossibilità di standardizzare la procedura del prelievo nel materiale fecale. Come dimostrano i nostri risultati neppure la lettura del segnale è standardizzabile in quanto è un'interpretazione personale dell'operatore soprattutto in quei campioni dove la quantità di emoglobina è scarsa.

D-22

IL "FIELD" DELLE CITOCHINE NELLE MALATTIE AUTOIMMUNITARIE.

S. A. Longo, R. Argento, F. Abenavoli, A. Scuteri, M.C. Berlinghieri
Cattedra ed U.O. di Patologia Clinica, DMSC, Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università degli Studi "Magna Græcia" Catanzaro.

Scopo del Lavoro

Nella patogenesi e nella evolutività delle malattie autoimmunitarie è presente un'alterazione della precisa regolazione di almeno uno dei circuiti di funzionamento del sistema immunitario. A questo livello svolgono un ruolo fondamentale le citochine, sia per il microambiente ("field") che esse determinano a livello locale e sistemico, sia per l'attività di "priming" sui linfociti T. Il microambiente è determinato in senso pro-infiammatorio (Th1) da IFN-γ ed IL-2 e TNF-α, in senso anti-infiammatorio (Th2) da IL-10 ed IL-4 e dall'attività immunomodulatoria di TGF-β. Uno dei progetti di ricerca del nostro laboratorio è quello di valutare il significato biologico, patogenetico e prognostico della variazione dei livelli sierici di citochine nei pazienti affetti da malattie autoimmunitarie.

Materiali e Metodi

Fino a questa fase dello studio sono stati arruolati 80 pazienti adulti selezionati sulla base della diagnosi clinica con significativi titoli di autoanticorpi, dosati con metodiche standard (IFI, Poiesys, Padova), rispettivamente 40 positivi per anti-ANA, anti-dsDNA, anti-ENA, 40 positivi per anti-LKM, anti-ASMA, anti-TPO, anti-TG, tali da suffragare la diagnosi clinica di malattie autoimmunitaria sistemica o d'organo. In tutti i soggetti sono stati misurati i livelli sierici di IL-10, IFN-γ, TGF-β con metodiche immunoenzimatiche (Nuclear Laser, Milano) ed utilizzando quali valori di riferimento, ottenuti dalla popolazione di controllo, rispettivamente: 5 pg/ml ,5 pg/ml e 38 pg/ml.

Risultati

Nel gruppo dei pz con malattie sistemiche 32 avevano valori elevati ad una o a più citochine, nell'altro gruppo di pz 35 presentavano la medesima situazione. Dei 30 pz con malattie sistemiche, già sottoposti a terapia immunomodulante: tutti avevano valori bassi di IFN-γ, 17 valori elevati di IL-10 e 23 presentavano un aumento significativo dei livelli di TGF–β. Dei 28 pz con malattie d'organo sottoposti a terapia, tutti avevano valori bassi di IFN-γ, 14 valori elevati di IL-10 e 21 valori elevati di TGF-β. Dei 10 pz del primo gruppo, non ancora sottoposti a terapia, 6 presentavano elevati livelli di IFN-γ, 2 di IL-10 e 1 di TGF-β. Nei 12 pz, senza terapia, del secondo gruppo 9 presentavano valori elevati di IFN-γ, 1 di IL-10 e 2 di TGF-β.

Discussione e Conclusioni

I dati sperimentali, precedentemente da noi ottenuti, suggeriscono che nelle malattie autoimmunitarie l'alterazione della regolazione citochinica coinvolga inizialmente l'attività biologica della popolazione linfocitaria Th1 e successivamente quella della Th2. I risultati più significativi di questo studio sono:

- la dimostrazione dell'efficacia della terapia immunomodulante nell'indurre e mantenere livelli bassi di IFN-γ;
- la necessità di instaurare terapia immunomodulante adeguata, tale da controllare l'evoluzione "sfavorevole" della malattia autoimmunitaria.

L'algoritmo laboratoristico dei pazienti con malattie autoimmunitarie può, dunque, a nostro avviso comprendere il dosaggio sierico di IL-10, IFN-γ e TGF-β per una migliore definizione della diagnosi e dell'evolutività della malattia.

D-23

PREVALENZA DEGLI ANTICORPI ANTI-CITRULLINA (CCP) NELL' ARTRITE REUMATOIDE (A.R.): CONFRONTO CON PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA DI STILL DELL'ADULTO. STUDIO PRELIMINARE.

Nunzi L., Govoni M*, Cavallini A.R., Dapporto M., Guerra G, Padovan M.*, Pizzicotti S., Telese F.*, Rigolin F.
Laboratorio di Patologia Clinica e Microbiologia , *Unità Operativa di Reumatologia Azienda Ospedaliera Universitaria Arcispedale S. Anna di Ferrara.

Scopo del lavoro
Gli anticorpi anti-CCP sono oggi considerati un importante marker sierologico nell' AR rilevante anche in senso prognostico nei confronti dello sviluppo di alterazioni erosive con una sensibilità superiore al 75% e una specificità superiore al 95%. Poiché la malattia di Still dell'adulto, nella quale a nostra conoscenza non è mai stata testata la presenza di tali anticorpi, può avere decorso caratterizzato dalla comparsa di una poliartrite cronica con aspetti simile a quelli dell'AR ponendo intuibili problemi di diagnosi differenziale, si è ritenuto opportuno ricercare la presenza di tali anticorpi anch in tale patologia.
Materiali e Metodi
Sono stati testati i sieri di 123 pazienti così suddivisi: 26 affetti da AR "established" (21 F , 5 M); 10 pazienti affetti da malattia di Still dell'adulto (AOSD) (5 F, 5 M); 26 pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) (23 F, 3 M); 4 pazienti con anticorpi circolanti anti-EBV, di classe IgM (2 M, 2 F); 57 soggetti sani di controlo (28 F, 29 M). E' stato utilizzato un kit ELISA della ditta Shield. I pozzetti della micropiastra sono stati coattati con peptidi di sintesi altamente purificati. Il coniugato conteneva un anticorpo monoclonale murino anti-IgG umane legato a fosfatasi alcalina. La curva di calibrazione è stata realizzata su 5 punti e due controlli (Pos e Neg).
Risultati
Il 19 su 26 pazienti affetti da AR (76 %) sono risultati positivi al test. Due su 26 pazienti affetti da LES (7.6 %) hanno presentato concentrazioni al di sopra del cut-off. Nei restanti gruppi di pazienti (AOSD, EBV+, controlli sani) le concentrazioni anitcorpali sono risultate ampiamente inferiori al valore soglia.
Conclusioni
I nostri dati, per quanto riguarda l'AR, confermano quanto già rilevato in letteratura [1,2]. Nei pazienti affetti da malattia di Still dell'adulto non è invece stata evidenziata la presenza di anticorpi anti-CCP, un risultato che è in sostanziale accordo con quanto rilevato in uno studio recente condotto su una casistica pediatrica ove, nella forma sistemica di poliartrite cronica giovanile (corrispettivo pediatrico della malatta di Still dell'adulto), non è stata riscontrata la presenza di tali anticorpi [3]. L'assenza di anticorpi anti-CCP nella malattia di Still dell'adulto potrebbe pertanto rivelarsi di utilità pratica in sede diagnostica differenziale nella variante della malattia con impegno poliartritico simil-reumatoide nei confronti dell'AR specialmente se sieronegativa per il Fattore Reumatoide. Si tratta naturalmente di dati preliminari che necessitano di ulteriori conferme su una casistica più ampia.

Bibliografia
1) Bizzarro N., Mozzanti G., Tonutti E., Villalta D., Tozzoli R.: Diagnostic accuracy of the anti-Citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. Clin Chem 2001; 47: 1089-1093.
2) Schellekens GA, Visser H, De Jong BAW, van den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC et al: The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum 2000; 43: 155-163
3) Avcin T., Cimaz R., Falcini F., Zulian F., Martini G., Simonini G., Porenta-Besic V., Cecchini G., Borghi M.O., Meroni P.L.: Prevalence and clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in juvenile idiopathic arthritis. Ann Rheum Dis 2002; 61: 608-611.

D-24

GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE ACUTA (GVHD): CONTROLLO DELLA PATOLOGIA CON L'UTILIZZO DI FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI

Rossi L., Birindelli S., Cordoni C., Deri D., Morini A., *Albiani A., *Martinelli L., Cappuccio A., Mugnaini P., Innocenti B.
Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1,
* U.O. Ematologia-Trapianto Midollo Osseo
Azienda Ospedaliera Pisana

Scopo del lavoro

La Graft-versus-Host Disease Acuta (GvHD) è una malattia multiorgano che in genere si manifesta nei primi novanta giorni susseguenti al trapianto di midollo osseo da donatore (TMO). E' causata dai linfociti T (T-Ly) del donatore reinfusi al paziente. In condizioni normali questi linfociti sono deputati alla protezione del singolo individuo dall'attacco di batteri, virus, funghi; nel caso di un trapianto da donatore, la popolazione T cellulare del donatore stesso, comunque presente nel materiale reinfuso (midollo, cellule staminali), riconosce come estraneo l'ospite, con "attacco" diretto contro i vari organi del paziente. Per prevenire i gravi effetti di GvHD possono essere utilizzati prevalentemente due metodi: la T-deplezione (consistente nella rimozione in laboratorio dal midollo del donatore, dei T-Ly usando un sofisticato meccanismo di centrifugazione per gradiente; è da sottolineare che alcuni linfociti possono rimanere dopo tale trattamento e giocare un ruolo fondamentale nella cosiddetta Graft-versus-Leukemia) oppure l'uso di una terapia farmacologica. Scopo del lavoro è stata la valutazione dell'effetto della terapia combinata di farmaci immunosoppressori nel controllo delle forme severe.

Materiali e metodi

La ciclosporina, un farmaco immunosoppressore che riduce l'attività dei T-Ly, non viene somministrata nei pazienti che ricevono il trapianto con la T deplezione. Nei pazienti non sottoposti a trapianto T-depleto viene somministrato metotrexate (MTX), oltre alla ciclosporina. Poiché l'azione farmacologica risulti efficace nel controllo della compliance di questo particolare paziente è necessario che la somministrazione di tali farmaci (e conseguentemente il dosaggio) siano attuati a tempi ben prestabiliti, seguendo uno scrupoloso protocollo post-trapianto. Il MTX viene somministrato a basse dosi ripetute dopo il trapianto (+1, +3, +6, +11 giorni), il relativo dosaggio la mattina successiva alla somministrazione (+2, +4, +7, +12 giorni); la CSA viene somministrata il giorno precedente il trapianto, successivamente due volte al giorno, mattina e sera; prima della somministrazione mattutina viene eseguito il prelievo per l'unico dosaggio giornaliero. Il MTX viene determinato con metodica MEIA (dosaggio immunoenzimatico a cattura di microparticelle) su analizzatore automatico TDX, la CSA con metodica FPIA (fluorescenza polarizzata) su analizzatore Axsym, entrambi della ditta ABBOTT.

Risultati

La combinazione di CSA e MTX è risultata estremamente efficace per ridurre la severità della GvHD. La somministrazione farmaceutica ha lo scopo di mantenere il paziente immunodepresso per tutta la durata del protocollo; al termine di questo periodo termina la somministrazione di MTX, mentre continua la terapia di mantenimento con CSA che verrà protratta per almeno 3-6 mesi, con controlli a diluire nel tempo.

Discussione e conclusioni

Lo scopo principale nell'applicazione di questo protocollo risulta essere il controllo post trapianto di questi pazienti con terapie controllate che sfruttino la minima dose di farmaci utilizzabile per il raggiungimento del migliore effetto terapeutico, senza rischiare spiacevoli effetti indesiderati o sovradosaggi nella somministrazione.

D-25

SCREENING DELLE PATOLOGIE AUTOIMMUNI NELLA TIROIDITE AUTOIMMUNE

De Remigis P.L., Vianale L.,Chiavaroli N..
*Faricelli R., *Lattanzio F.M.,*Gioia S.,*Filippi G., *Martinotti S.
UO Endocrinologia – Centro Regionale Tireopatie
* Patologia Clinica - Ospedale Clinicizzato Chieti

Scopo del lavoro
Le malattie autoimmuni tendono ad associarsi nello stesso soggetto e in ambito familiare, tanto che tale associazione viene assunta come criterio diagnostico. La tiroidite autoimmune (TA) rappresenta la forma di gran lunga più frequente tra le patologie autoimmuni (Jacobson DL, et all - Cl.Imm. and Immunopath, 1987) e pertanto è spesso la prima diagnostica in ambito di tali affezioni.
Materiali e metodi
Sono stati presi in considerazione 2 gruppi di soggetti:

1) 452 con tiroidite autoimmune, (età media di 44,3 anni, 408 di sesso femminile (90%) e 44 maschile (10 %);
2) 7074 soggetti non affetti da tiroidite, con età media di 46,5 anni, 6083 di sesso femminile (86%) e 991 maschile (14%).

Il numero totale della colonna 2 della tabella si riferisce ai prelievi eseguiti per ciascun esame
La diagnosi di tiroidite autoimmune è stata definita sulla base della positività degli AbTg e/o AbTPO.
Sono stati valutati gli anticorpi elencati in tabella utilizzando le metodiche di immunoflorescenza indiretta e immunoenzimatica.
E' stata eseguita una valutazione statistica dei dati con t di Student
Risultati

ANTICORPI	**TIREOPATICI**			**TOTALI**			T Student
	1	2		1	2		
	n.posit	n.tot	%	n. posit	n. tot	%	
- ANA	45	352	**12,8**	199	1664	**11.9**	NS
- AMA	1	338	**0,295**	10	1161	**0,86**	NS
- ASMA	9	335	**2,68**	75	1199	**6,26**	NS
- antiDNA	0	352	**0,0**	2	1170	**0,17**	NS
- ENA	11	339	**3,24**	38	1155	**3,29**	NS
- SSA	6	339	**1,76**	27	1160	**2,32**	NS
- SSB	6	339	**1,76**	17	1160	**1,47**	NS
- Sm	5	339	**1,47**	9	1160	**0,78**	NS
- SmRNP	7	339	**2,06**	15	1160	**1,29**	NS
- Scl-70	1	339	**0,29**	3	1160	**0,26**	NS
- Jo-1	1	339	**0,29**	1	1160	**0,09**	NS
- F.REUM	***34***	***358***	***9,4***	***274***	***4727***	***5,8***	***P<0.01***
- F.REUM - ANA	***28***	***201***	***14,4***	***82***	***700***	***11,7***	***P<0.01***
- EMA	4	260	**1,53**	37	1519	**2,44**	NS
- AGA	4	260	**1,53**	40	1519	**2,63**	NS
- ATL	9	50	**18**	224	1059	**21,15**	NS

I risultati dimostrano che nella TA la frequenza degli anticorpi da noi considerati non è aumentata rispetto alla popolazione generale, tranne che per il Fattore Reumatoide e soprattutto nei soggetti che erano risultati ANA positivi.
Discussione e Conclusione
Si evidenzia una bassa frequenza in senso assoluto di altri autoanticorpi nella TA e nella popolazione in generale. Inoltre i risultati non darebbero ragione ad uno screening autoimmunitario nella TA, tranne che per il fattore Reumatoide e per gli ANA, visto che non si osserva un aumentata frequenza di altri anticorpi nella TA. In conclusione và sottolineata come nella TA è necessaria una maggiore attenzione agli aspetti clinici per altre patologie autoimmuni da integrare eventualmente con gli indici di laboratorio.

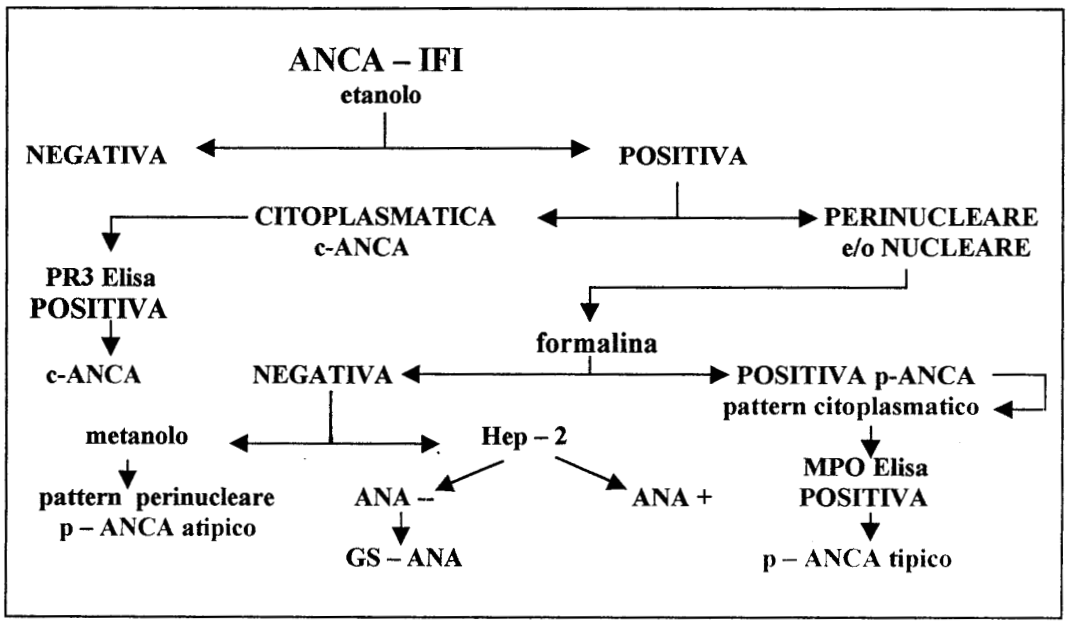
D-26

ANCA : ITER DIAGNOSTICO GUIDATO IN DUE CASI CLINICI

C. Maida , R. Pica, M. Ruggeri
U.O.D. Medicina di Laboratorio 1 , Azienda Ospedaliera S. Giovanni- Addolorata, Roma

Scopo del lavoro
Uso di un iter diagnostico ragionato nella determinazione degli ANCA in due casi clinici per una migliore individuazione del pattern fluoroscopico ed una più precisa diagnosi clinica.

Materiali e metodi
Sono stati osservati due pazienti che presentavano all'IFI una identica positività p-ANCA su granulociti fissati in etanolo. e quindi lo stesso pattern fluoroscopico E' stato applicato ad entrambi l'iter diagnostico sotto riportato giungendo a due quadri diagnostici differenti pur in presenza dello stesso pattern fluoroscopico.



Risultati
Il paziente 1 presentava una negatività ANCA in formalina mentre gli ANA su Hep-2 risultavano positivi ad un titolo di 1:160.
Il paziente 2 invece mostrava una positività di tipo c-ANCA in formalina e positività per gli anticorpi antiMPO (32 U).

Discussione e Conclusioni
I dati ottenuti ci fanno escludere verosimilmente una diagnosi di vasculite nel primo caso,che invece deve essere tenuta in considerazione nel secondo caso.La descrizione di questi due casi clinici ci deve far riflettere sulla oppurtunità di non limitarsi alla sola determinazione degli ANCA su etanolo nei casi di positivtà ma di continuare ad indagare per escludere false positività e meglio definire i vari pattern degli ANCA fornendo al clinico un più sicuro supporto diagnostico.

D-27

RICERCA DI ANTICORPI ANTI HHV-8 NELLE GAMMAPATIE MONOCLONALI

Sereno S*. , Ruggeri M°. , Recchia O°.

* Università La Sapienza: Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali Roma
° Azienda Ospedaliera S.Giovanni - Addolorata Roma

Obiettivo: Studi di biologia molecolare con vari tipi di PCR (polymerase chain reaction)hanno fatto ipotizzare l'associazione tra HHV-8 (herpesvirus 8) ,Mieloma,MGUS ,Amiloidosi primaria e macroglobulinemia di Waldenstrom, nonché l'intervento del virus nella evoluzione maligna della MGUS.
Dalla ricerca biomolecolare emergono dati contrastanti,attribuibili a variazioni di metodo, assortimento di primers, scelta delle sequenze target, inquinamenti.
Si affiancano ai precedenti, studi epidemiologici condotti mediante indagini sierologiche con diversi tipi di antigeni.in diversi gruppi di patologie e in diversi gruppi etnici..
La nostra ricerca valuta la presenza di anticorpi anti HHV-8 nelle gammapatie monoclonali di varia origine nella popolazione afferente a un ospedale di Roma..
Materiale e metodi: 226 sieri sottoposti a elettroforesi nella routine del laboratorio, caratterizzati da componenti monoclonali, sono stai via via congelati e conservati a -20°C.,in attesa della ricerca anticorpale.
Sono stati esaminati per confronto, i sieri di 157 soggetti HIV sieropositivi (24 Tossicodipendenti,,93 eterosesex,25 omosex,7 sarcomi di Kaposi), e 67 sieri di donatori di sangue.
La ricerca degli anticorpi anti HHV-8 è stata effettuata con un sistema immunoenzimatico commerciale (Advanced Biotechnologies,inc.Columbia MD:USA),costituito da lisato di antigene prodotto sulla linea cellulare KS-1,esente da contaminazione con altri herpesvirus e micoplasma, in grado, per la sua caratteristica di lisato virale, di misurare gli anticorpi diretti contro la maggior parte delle proteine strutturali virali.
Per verificare la capacità di produzione di anticorpi verso gli herpesvirus nei soggetti con gammapatia monoclonale, è stata eseguita la ricerca di anticorpi anti EBNA e VCA e anti CMV.
Risultati: Tutti i sieri riferiti a Mieloma (16) e a MGUS (10) sono risultati negativi alla ricerca di anticorpi anti HHV-8.
Sono risultati negativi anche i sieri riferiti a Linfoma (4),e Macroglobulinemia di Waldenstrom (1)
Sono risultati positivi : 1 siero riferito ad Amiloidosi primaria e 8/194 sieri appartenenti a gammapatie monoclonali di varia origine (infettiva,,disreattiva ecc...)
Sono risultati positivi 23 sieri riferiti a soggetti HIV sieropositivi : 3/32 TD, 5/93 eterosex, 8/25 omosex, 7/7 S.Kaposi.
Nessuno dei 67 donatori di sangue è risultato positivo,
Gli anticorpi anti EBV e/ o anti CMV sono risultati presenti nella totalità dei soggetti con gammapatia monoclonale.
Conclusioni: La presenza di anticorpi anti HHV-8 nei soggetti con gammapatia monoclonale (3.98%) è di gran lunga inferiore a quella osservata nel gruppo dei sieropositivi HIV (14.6%) La differenza è altamente significativa ($P<0.001$)
I risultati ottenuti non depongono per una evidente associazione HHV-8 - Mieloma ,pur avendo utilizzato un test che consente di rilevare anticorpi sia verso l'antigene litico che verso l'antigene latente.
Né i nostri risultati si possono spiegare con una risposta anticorpale inefficace,in quanto è preesnte la normale risposta agli altri herpesvirus sia gamma che beta.
Tuttavia, tenendo conto della lunga latenza del virus nell'ospite, è opportuno seguire attentamente il quadro clinico dei pazienti, nell'ipotesi che l'evidenza di anticorpi specifici sia predittiva non solo della comparsa di S.di Kaposi,ma anche dello stimolo che l'omologo virale della IL 6 potrebbe esercitare sulle cellule mielomatose.

D-28

ANTICORPI ANTI-CITRULLINA: AUMENTATA SENSIBILITA' DEL TEST DI SECONDA GENERAZIONE MEDIANTE IMPIEGO DI UN NUOVO PEPTIDE CICLICO DI SINTESI.

N. Bizzaro [1] e W.J. van Venrooij [2]

[1] Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S.Donà di Piave (VE)
[2] Department of Biochemistry, University of Nijmegen, The Netherlands.

Introduzione

Gli anticorpi anti-citrullina (anti-peptide ciclico citrullinato, anti-CCP) sono un marcatore con una specificità del 98-99% per l'artrite reumatoide (AR). La loro sensibilità diagnostica è tuttavia piuttosto bassa, aggirandosi intorno al 50-60%. Il test immunoenzimatico messo a punto da Schellekens e van Venrooij si avvale di un substrato antigenico ottenuto sinteticamente costituito da un peptide ciclico, nel quale l'aminoacido arginina è sostituito dall'aminoacido citrullina. A causa della bassa sensibilità del test di prima generazione (peptide cfc1-cyc), è stato di recente messo a punto un test di seconda generazione nel quale il substrato è costituito da un nuovo peptide ciclico (peptide x10-cyc). In questo studio eseguito nei due laboratori degli autori su casistiche diverse, sono state valutate le caratteristiche di sensibilità e specificità di questo nuovo test (CCP-2) in rapporto ai risultati ottenuti con il test di prima generazione (CCP-1).

Materiali e metodi

Sono stati studiati complessivamente 1616 campioni, costituiti da 232 sieri di pazienti affetti da AR definita secondo i criteri ACR, da 1206 sieri di pazienti con varie malattie infiammatorie croniche (connettiviti, altre malattie reumatiche, rettocolite ulcerosa, morbo di Crohn, ecc.), infezioni virali e batteriche, neoplasie, gammopatie monoclonali, malattie autoimmuni della tiroide e da 178 soggetti sani. Il dosaggio degli anticorpi anti-CCP è stato eseguito con i test ELISA di prima e seconda generazione prodotti da EuroDiagnostica, Arnhem, Olanda.

Risultati

L'analisi comparativa dei dati relativi alla sensibilità e alla specificità dei due metodi, calcolate mantenendo lo stesso valore di cut-off di 50 unità, ha dimostrato un netto miglioramento della sensibilità che è salita dal 46% del test CCP-1 al 60.2% del test CCP-2, con una differenza di +14.2% nella casistica italiana, e dal 68 al 78%, con un miglioramento di 10 punti percentuali, in quella olandese. Di notevole interesse è risultato anche il dato relativo alla specificità che, nonostante il consistente incremento della sensibilità, è anch'essa aumentata dello 0.5% e del 1.2% nelle due casistiche studiate.

Discussione

Gli anticorpi anti-CCP sono indubbiamente uno tra gli anticorpi più interessanti apparsi sulla scena negli ultimi anni. La loro elevata specificità e l'alto valore predittivo positivo, associati al significato prognostico per lo sviluppo di artrite progressiva erosiva, ne consentono l'impiego sia a scopo diagnostico che prognostico nei pazienti con AR. La scarsa sensibilità del metodo di prima generazione, inferiore a quella del fattore reumatoide (FR), ne aveva consigliato l'impiego come test di secondo livello da eseguirsi in soggetti FR positivi. Il consistente aumento di sensibilità ottenuto con il test di seconda generazione che mantiene nel contempo un'elevatissima specificità, ne ripropone la collocazione come possibile test di primo livello in soggetti con sospetto di AR. E' probabile che il passo decisivo verso la completa adozione di questo test da parte dei laboratori clinici si realizzi non appena sarà possibile eseguirne il dosaggio in maniera automatizzata e la maggiore diffusione del test ne consenta contemporaneamente una riduzione dei costi.

D-29

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ANTICORPI ANTI-OXLDL QUALE MARKER PER LESIONI ATEROSCLEROTICHE.

C.Monica*,C.Bonaguri*, A.Russo*, R.Aloe*, S.Caronna°, L.Arsenio°

- Dipartimento Diagnostica di Laboratorio,Laboratorio Analisi Emato-Chimiche, Azienda Osp.Parma
- ° Centro per lo Studio e la Terapia delle Dislipidemie, Azienda Osp.Parma

Scopo del Lavoro

Il dosaggio degli anticorpi anti-OxLDL è stato recentemente proposto quale marker predittivo e di lesione nei processi aterosclerotici. Scopo di questo studio è stato : a) Valutare i livelli di anticorpi anti-OxLDL in gruppi di soggetti con patologie dismetaboliche a differente rischio di complicanze aterosclerotiche; b) Valutare nei gruppi di patologie la possibile associazione fra livelli di anti-OxLDL e altri markers di aterosclerosi: anticorpi anti-Cardiolipina, parametri dell'assetto lipidico, Omocisteina.

Materiali e Metodi

Sono stati valutati 148 pazienti suddivisi nei seguenti gruppi: Diabetici tipo I(24), Diabetici tipo II(30), Dislipidemici(35), Obesi(30), Cardiopatici(17), Controlli(12): I pazienti sono stati valutati per i seguenti parametri clinici: anticorpi anti-OxLDL,anticorpi anti-Cardiolipina, B.M.I., Colesterolo tot., Col.HDL, Col LDL, HbA1c, Omocisteina.Gli Ab anti-OxLDLsono stati dosati con una metodica ELISA (IMMCO Diagnostics) e sono stati considerati positivi i campioni con valori di concentrazione >20 EU/mL.

Risultati

	Ab anti-OxLDL		***Trigliceridi***	***Col.tot***	***Col.HDL***	***Col.LDL***
	Valore medio (D.S.)	% Pos	Valore medio (D.S.)	Valore medio (D.S.)	Valore medio (D.S.)	Valore medio (D.S.)
Diabetici Tipo I(24)	8.3 (6.2)	12.5 (3/24)	71.5 (27.4)	192.2 (34.1)	58.8 (16.0)	116.2 (38.8)
Diabetici *Tipo II (30)*	7.0 (7.7)	3.3 (1/30)	131.6 (74.0)	216.0 (44.1)	46.6 (10.2)	143.0 (30.4)
Obesi (30)	14.2 (21.4)	13.3 (4/30)	112.3 (105.4)	213.7 (44.3)	54.2 (16.7)	141.0 (34.1)
Dislipidemici (35)	13.5 (21.8)	17.1 (6/35)	131.0 (81.6)	248.9 (54.9)	53.5 (15.2)	154.4 (36.3)
Cardiopatici (17)	12.1 (8.8)	17.7 (3/17)				
Controlli (12)	7.4 (7.2)	8.3 (1/12)				

Discussione e Conclusioni

L'analisi dei risultati consente di rilevare come i pazienti dislipidemici, obesi e cardiopatici mostrino valori medi di Ab anti-OxLDL (13.5, 14.2, 12.1) e % di positività (17.1% ,13.3% ,17.7%) maggiori rispetto ai pazienti diabetici(tipo I e tipo II) e ai controlli (8.3, 7.0, 7.4 e 12.5%, 3.3%, 8.3%); tuttavia, le differenze osservate indicano solamente una tendenza e i confronti non risultano statisticamente significativi; inoltre, la variabile anti-OxLDL è risultata in un'analisi di regressione lineare indipendente da tutti i parametri dell''assetto lipidico (Vaarala et al. Journal of Internal Medicine vol 247).

D-30

IPOTIROIDISMO SUBCLINICO E DIABETE MELLITO DI TIPO I (T1DM)

Tumini S., Anzellotti M.T., Puglielli C., Mohn A. Di Luzio R., Febo F. Faricelli R.*, LattanzioF.M.*, Gioia S.*, Filippi G.*, D'Alleva L.*, Rabottini S.*,Fulvi S.*, Previti G.*, Matera S.*, Pasutto F.*,Martinotti S.*, Chiarelli F.

Clinica Pediatrica, Laboratorio di Patologia Clinica, Università di Chieti

Scopo del lavoro

Il diabete mellito di tipo I si associa di frequente ad altre patologie autoimmuni. In particolare è stata documentata una elevata incidenza di tiroidite autoimmune. E' inoltre stato dimostrato che l'associazione con altre patologie autoimmuni influenza il controllo metabolico. Lo scopo di questo studio è di valutare la prevalenza di tiroidite autoimmune e di ipotiroidismo subclinico ed di eventuali interferenze con il controllo metabolico in una popolazione di bambini ed adolescenti con T1DM.

Materiali e metodi

Sono stati studiati attraverso un studio caso-controllo retrospettivo 190 pazienti con T1DM con età di 12.7 ± 4,6 anni e durata 5,1 ± 3,9 anni con diabete mellito di tipo I (T1DM). Lo screening per le patologie tiroidee è stato effettuato attraverso la valutazione dei livelli di TSH, FT4, FT3, Ab anti TPO e Ab anti Tg su siero effettuato annualmente presso il centro diabetologico in cui vengono seguiti. I pazienti con gli anticorpi positivi sono stati considerati affetti da tiroidite autoimmune; la presenza di TSH >5 mUI/l con FT4 normale configurano un quadro di ipotiroidismo subclinico; un TSH >5 mUI/l con FT4< 7.7 pmol/l indicano un ipotiroidismo clinico. Il controllo metabolico è stato valutato attraverso l'emoglobina glicosilata (HbA1c) e attraverso la valutazione del diario di terapia a 12, 6 e 3 mesi prima e dopo la diagnosi di ipotiroidismo.

Risultati

La positività agli anticorpi è stata riscontrata in 29 pazienti dei 190 studiati. Valori di TSH>5mUI/l con FT4 nella norma sono stati riscontrati in 11 pazienti. Gli 11 pazienti con ipotiroidismo subclinico sono stati confrontati con 30 pazienti con T1DM. Non sono risultate differenze significative tra i due gruppi né per l'età né per durata del diabete. Dall'osservazione dei diari di terapia si è riscontrato che i pazienti con ipotiroidismo subclinico presentano un numero maggiore di ipoglicemie sintomatiche non spiegabili dalle modificazioni della terapia insulinica né dalla presenza di un'eventuale attività fisica non programmata. Inoltre nei bambini più piccoli si sono manifestate ipoglicemie ricorrenti con prevalenza di sintomi neurologici fino alle convulsioni.

Discussione e conclusioni

La prevalenza di tiroidite autoimmune è risultata pari al 15,3%. La prevalenza di ipotiroidismo subclinico è stata del 5,8%. I valori di HbA1c sono risultati sovrapponibili tra i due gruppi. Inoltre l'ipotiroidismo subclinico non diagnosticato si associa ad un aumentato rischio di ipoglicemie già a 12 mesi prima della diagnosi con un picco al momento della diagnosi. Le ipoglicemie si risolvono entro sei mesi dall'inizio della terapia sostitutiva con ormone tiroideo.
I dati evidenziati da questo studio indicano la necessita di effettuare lo screening per le patologie tiroidee nei pazienti con diabete e la necessità di iniziare un trattamento precoce .

D-31

POSSIBILE COINVOLGIMENTO DEL TGFβ-1 NELL'INDUZIONE DELLA "CHRONIC LUNG DISEASE" NEI NEONATI PREMATURI: EFFETTI DI DUE DIFFERENTI TECNICHE VENTILATORIE (HFOV E CMV) SUI LIVELLI DI ALCUNE CITOCHINE INFIAMMATORIE E PROFIBROTICHE NEL SIERO E NEL LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE .

E. Capoluongo*, G. Vento°, L. Bianucci*, P.G. Matassa°, L. Tortorolo°, C. Romagnoli°, F. Ameglio§.

**Laboratorio di Patologia Clinica Universita' Cattolica S. Cuore – Ospedale "L'Immacolata" – Celano (AQ); °Divisione di Neonatologia, (UCSC), Roma; §Laboratorio di Patologia Clinica e Microbiologia, Ist. San Gallicano IRCCS, Roma*

- *Scopo del lavoro*

Lo scopo è stato quello di verificare se la presenza di differenti livelli di citochine proinfiammatorie e profibrotiche nel siero e nel lavaggio broncoalveolare (BAL) è correlata all'utilizzo di due diverse tecniche di ventilazione dei neonati prematuri ed al miglioramento della "compliance" polmonare.

- *Materiali e Metodi*

E' stato eseguito uno studio randomizzato su 24 neonati con età gestazionale (EG) minore di 30 settimane: 12 neonati sono stati trattati con Ventilazione Oscillatoria ad alta frequenza (HFOV) [EG: 26 (24-29) settimane, peso 940 (570-1070)g] e 12 con Ventilazione Meccanica Convenzionale (CMV) [EG: 27 (25-29) settimane, peso 860 (500-1500)g]. Durante il periodo di trattamento ventilatorio, sono stati effettuati test di funzionalità respiratoria e dosaggi ELISA (R&D Systems) su siero e BAL dei seguenti marcatori infiammatori e profibrotici: IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, LIF, PDGF, PDGF, VEGF, TGFβ-1. Tutti i precedenti parametri sono stati determinati a 1, 3, 5, 7 giorni dall'avvio del trattamento. I dosaggi delle citochine nel BAL sono stati corretti con il metodo dell'urea (dosaggio con metodica per Olympus AU400).

- *Risultati*

1) **Livelli sierici di citochine**: IL-6, IL-8 e IL-10 erano significativamente correlate l'una all'altra cosi come PDGF, VEGF e TGFβ-1, in maniera indipendente dal trattamento. I livelli di IL-6, IL-8 e IL-10 diminuivano significativamente durante il trattamento con HFOV, mentre nei pazienti trattati con CMV non si osservavano tali variazioni. 2) **Livelli di citochine nel BAL**: i livelli di IL-6 erano correlati significativamente con quelli di IL-8 e IL-10; PDGF, VEGF e TGFβ-1 erano correlati significativamente gli uni agli altri indipendentemente dal trattamento. Nei campioni raccolti a 1 e 3 giorni i livelli di TGFβ-1 erano significativamente più bassi in HFOV rispetto ai pazienti trattati con CMV ($p<0.05$). Le concentrazioni di MCP-1 correlavano con i valori delle resistenze espiratorie ($R= 0.52$). 3)**Test di funzionalità respiratoria:** I valori di "compliance dinamica" erano significativamente più elevati nei pazienti trattati con HFOV (rispetto a CMV) a 1, 3, 5 giorni ($p<0.05$), ad eccezione di quelli del 7° giorno. I valori delle resistenze espiratorie erano significativamente inferiori nei pazienti con HFOV a 3 e 5 giorni ($p<0.05$). Infine, solo tra i pazienti trattati con CMV sono stati riscontrati 5 casi ($p<0.05$) di broncodisplasia severa (classificazione di Jobe-Bancalari).

- *Discussione e Conclusioni*

Sulla base dei dati preliminari riguardanti la compliance respiratoria ed i comportamenti di alcune citochine (TGFβ-1), HFOV appare una tecnica valida e riproducibile per migliorare la meccanica ventilatoria e l'outcome polmonare a distanza inteso come assenza di ossigeno-dipendenza a 36 settimane post-concezionali (BPD severa). Il TGFβ-1 nel BAL potrebbe infine dimostrarsi un utile marker predittivo di sviluppo di chronic lung disease nei neonati sottoposti a terapia ventilatoria.

D-32

Confronto tra procalcitonina e proteina C reattiva nella popolazione neonatale nelle prime 72 ore di vita: risultati preliminari

S. Pastori[1], S.A. Mazzola[1], E. Fornara[1], L.M.M. Marchetti[1] , L. Mistura[2], A. Rosco[2], C. Bonfanti[2], R. Giachino[2].
[1]Servizio di Medicina di Laboratorio, Az. Osp. "G.Salvini" di Garbagnate Milanese; [2]Divisione di Pediatria, Az. Osp. "G.Salvini" di Garbagnate Milanese.

Scopo del lavoro
La Proteina C Reattiva (CRP) è una proteina di fase acuta, usata come indicatore precoce e sensibile delle infezioni in età pediatrica (I e II infanzia) e nei neonati, nonostante la sua relativa aspecificità. La procalcitonina (PCT) è un propeptide di 116 aa. da cui deriva per proteolisi postrascrizionale l'ormone calcitonina. L'aumento della PCT è stato associato in letteratura alla diagnosi precoce ed al monitoraggio della sepsi e delle infezioni batteriche: il suo incremento è correlato con la gravità dell'infezione, diminuendo rapidamente dopo terapia antibiotica efficace. Scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare CRP e PCT in neonati sani e non, per cercare di comprendere sensibilità e specificità nell'ambito di differenti condizioni patologiche, soprattutto in relazione a fenomeni di colonizzazione e a episodi infettivi di natura batterica.

Materiali e Metodi
Lo studio è stato effettuato raccogliendo i sieri di 46 neonati. Per ciascun neonato sono stati eseguiti 5 prelievi seriati ad orari fissi dalla nascita (tempo 0, dopo 9, 24, 39 e 72 ore) onde ridurre il più possibile le interferenze da variabilità interindividuale, e in modo da avere una idea più precisa dell'andamento della PCT nelle prime ore di vita. I 46 neonati sono stati arruolati per la presenza di fattori di rischio di infezione e raggruppati in più categorie: 33 neonati a termine normopeso, 5 dismaturi , 5 prematuri, 3 con sofferenza neonatale; di questa casistica 25 sono risultati colonizzati (di cui 6 trattati con antibioticoterapia sulla base dell'andamento della PCR). Sui sieri, aliquotati e congelati a –20° C fino al momento dell'analisi, sono stati dosati in parallelo la CRP (CRP-US su strumento Hitachi 911 – Roche) e la PCT (LUMItest PCT della ditta Brahms - distribuito da DASIT).

Risultati
Nella tabella sono riportati i valori medi e la varianza campionaria dei valori di PCT e CRP nelle varie classi di pazienti calcolati sui prelievi effettuati alla nascita, a 24 e 72 ore di distanza da essa.

	NASCITA				ORE 24				ORE 72			
	CRP		PCT		CRP		PCT		CRP		PCT	
	μ	CV	μ	CV	μ	CV	μ	CV	μ	CV	μ	CV
NON COLONIZZ.	0.03	0.98	036	0.55	0.79	2.99	2.81	1.01	0.46	2.15	1.09	1.70
COLONIZZATI	0.04	1.18	0.42	0.70	0.74	1.09	2.23	0.63	0.46	1.13	1.28	0.98
SOFF. NEON.	0.05		2.32		4.28		19.35		1.68		11.34	

Discussione e Conclusioni
Dai nostri dati non si evidenzia una differenza rilevante tra i pazienti colonizzati e quelli non colonizzati. In compenso è stato evidenziato nei pazienti con sofferenza neonatale un aumento sensibile dei valori di PCT di non sicura interpretazione (possibile segno di danno d'organo? Stress?). I dati qui riportati non sono definitivi essendo lo studio ancora in corso. Il nostro lavoro ha confermato la presenza di un picco fisiologico alla 24esima ora dalla nascita, già descritto nei pochi lavori presenti in letteratura, anche se il valore medio alla 72esima ora è risultato decisamente più alto. Rimane sicuramente ancora aperto il problema di una corretta interpretazione del dato PCT nelle prime 72 ore di vita dei neonati, dove la curva fisiologica (da ricambio metabolico?) e la variabilità biologica molto alta rendono la PCT ancora poco maneggevole rispetto all'uso che se ne fa in età adulta.

D-33

La procalcitonina come indicatore precoce di complicanze infettive postoperatorie

E. Marasti[1], S. Freggia[1], P. Chiarugi[1], AR. Miele[1], P. Biondi[2],
[1]U.O. Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche 1°, [2]U.O. Rianimazione 4ª
Azienda Ospedaliera Pisana (PI)

Scopo del lavoro

Abbiamo valutato se il dosaggio della procalcitonina potesse individuare precocemente lo sviluppo di episodi infettivi e settici nel periodo postoperatorio.

Materiali e Metodi

In 29 pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia addominale maggiore, sia laparotomica che laparoscopica a livello intestinale, sono stati eseguiti dosaggi sequenziali di procalcitonina, con la metodica BRAHMS LUMItest PCT distribuita da DASIT S.p.A., e di proteina C reattiva (PCR), con la metodica Tina-quant CRP Roche, subito prima e subito dopo l'intervento ed ogni giorno per i cinque giorni successivi. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il test t di Student e l'analisi della varianza, suddividendo sulla base del giudizio clinico un gruppo di pazienti con decorso postoperatorio regolare ed uno con sopraggiunte complicanze infettive.

Risultati

Nove pazienti sono andati incontro a vari eventi infettivi (ascesso, polmonite, peritonite, sepsi) e venti hanno avuto un decorso privo di complicanze. I livelli basali di procalcitonina non erano mediamente dissimili nei due gruppi (0.24 vs 0.26 ng/ml) mentre un netto incremento si è osservato in tutti i pazienti già dal primo giorno dopo l'operazione, ma con valori significativamente più alti in coloro che poi sono andati incontro a complicanze (4.9 vs 0.67 ng/ml, $p<0.001$). Anche l'andamento della PCR mostrava un brusco innalzamento in prima giornata con un picco in seconda, ma soltanto dalla quarta si è cominciato ad osservare una differenza statisticamente significativa fra i due gruppi (187.7 vs 114.3 mg/l, $p<0.05$)

Discussione e Conclusioni

Alla luce della nostra seppur limitata casistica, emergono interessanti potenzialità circa l'utilizzo della procalcitonina come variabile predittiva precoce di complicanze infettive dopo un intervento di chirurgia maggiore, soprattutto considerando la sua migliore performance rispetto ad altri marcatori precoci di flogosi come la PCR, in linea con quanto affermato anche in altri studi [1].

1. Reith HB et al.: Procalcitonin in early detection of postoperative complications. Dig Surg 1998; 15:260-265.

D-34

Valutazione della determinazione con test rapido della procalcitonina in pazienti in terapia intensiva

L. Papotto[1], M. Baroni[1], G. Gasparri[1], P. Chiarugi[1], AR. Miele[1], P. Malacarne[2], M. Roma[2], A. Pasellini[2]
[1]U.O. Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche 1°, [2]U.O. Anestesia e Rianimazione 2ª
Azienda Ospedaliera Pisana (PI)

Scopo del lavoro

Valutare l'accuratezza diagnostica del dosaggio in regime d'urgenza della procalcitonina come marcatore precoce di sepsi, sepsi severa e shock settico.

Materiali e Metodi

In 77 pazienti ricoverati per almeno 48 ore in sei mesi consecutivi nel reparto di rianimazione abbiamo valutato lo stato di SIRS (sindrome da risposta infiammatoria sistemica), sepsi, sepsi severa o shock settico ed è stato eseguito il dosaggio semiquantitativo della procalcitonina con metodo immunocromatografico rapido (BRAHMS PCT-Q distribuito da DASIT S.p.A.) che permette di evidenziare una banda colorata dopo 30 minuti d'incubazione quando la concentrazione di procalcitonina è superiore a 0,5 ng/ml. In accordo con l'American College of Chest Physicians e la Society of Critical Care Medicine, i criteri clinici per la definizione di SIRS, sepsi, sepsi severa e shock settico sono stati i seguenti:

SIRS: almeno due dei seguenti criteri

1. Temperatura > 38° o <36°
2. Frequenza Cardiaca >90 battiti/minuto
3. Frequenza Respiratoria >20 respiri/minuto o PaC02 <32 torr (<4,3 KPa)
4. Globuli Bianchi >12000/µL o < 4000/ µL o >10% di forme immature

Sepsi: criteri di SIRS in presenza d'infezione

Sepsi Severa: sepsi associata a disfunzione d'organo, ipoperfusione o ipotensione.

Shock settico: ipotensione indotta da sepsi che persiste malgrado un adeguato riempimento volemico, con presenza di anormalità di perfusione e di disfunzione d'organo.

Risultati

Il dosaggio della procalcitonina è risultato positivo (≥0,5 ng/ml) in 39 pazienti dei quali, 13 non hanno sviluppato infezioni, 8 sono andati incontro a sepsi, 13 a sepsi severa e 5 a shock settico e negativo in 38, dei quali 18 non hanno sviluppato infezioni e 20 sono andati incontro a sepsi ma non a sepsi severa o shock settico. La sensibilità diagnostica del test è risultata di conseguenza del 55,3% mentre la specificità del 56,6% se si considera la procalcitonina come marcatore generico di infezione. La specificità e il valore predittivo negativo salgono però al 100% se si prendono in esame soltanto gli stati di shock settico e sepsi severa.

Discussione e Conclusioni

Il nostro studio ha dimostrato che nei pazienti a rischio ricoverati in un'unità di rianimazione il dosaggio semiquantitativo della procalcitonina ha scarsa sensibilità e specificità per la diagnosi d'infezione. Questo test non è infatti risultato in grado di discriminare chiaramente fra SIRS e sepsi. Del resto, si può evincere dalla letteratura che l'induzione di procalcitonina spesso non è correlata al focolaio infiammatorio batterico ma avviene attraverso un'iperattivazione generale del sistema immunitario. Tuttavia, il test rapido BRAHMS PCT-Q in virtù del suo alto valore predittivo negativo può essere utilizzato per facilitare precocemente e rapidamente la diagnosi di esclusione di sepsi severa e shock settico.