

Riassunti delle Comunicazioni Poster, delle Comunicazioni Selezionate e delle Comunicazioni Poster Segnalate all'Editorial Board

GRUPPO A:	Diagnostica ematologica	A-01 – A-24	122
	Diagnostica della coagulazione	A-25 – A-29	134
GRUPPO B:	Diagnostica immunologica	B-01 – B-25	136
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	<i>B-26</i>	149
	Diagnostica allergologica	B-27 – B-34	149
	<i>Comunicazioni Selezionate</i>	<i>B-35 – B-36</i>	153
GRUPPO C:	Automazione	C-01 – C-02	154
	Informatica - Telematica	C-03 – C-04	155
	Organizzazione - Gestione	C-05 – C-18	156
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	<i>C-19</i>	163
	Standardizzazione - Controllo di qualità	C-20 – C-23	164
	Qualità - Accredimento - Certificazione	C-24 – C-29	166
GRUPPO D:	Diagnostica microbiologica	D-01 – D-16	169
	<i>Comunicazioni Selezionate</i>	<i>D-17 – D-18</i>	177
GRUPPO E:	Evidence Based Medicine	E-01 – E-03	178
	<i>Comunicazione Selezionata</i>	<i>E-04</i>	179
	Diagnostica del sistema nervoso centrale	E-05 – E-07	180
	Indicatori di neoplasia	E-08	181
	Indicatori di lesione d'organo	E-09 – E-18	182
	Diagnostica nelle infiammazioni	E-19 – E-20	187
	Indicatori di metabolismo osseo	E-21 – E-22	188

GRUPPO F:	Malattie genetiche <i>Comunicazione Selezionata</i>	<i>F-01</i>	189
	Biologia molecolare	F-02 – F-11	189
	Malattie metaboliche	F-12 – F-15	194
	Biochimica e patologia cellulare	F-16	196
	Enzimi - Ormoni - Proteine - Lipidi - Lipoproteine <i>Comunicazione Selezionata</i>	F-17 – F-25 <i>F-26</i>	197 201
GRUPPO G:	Valutazione metodi	G-01 – G-12	202
	Valutazione sistemi	G-13 – G-23	208

RIASSUNTI DELLE COMUNICAZIONI POSTER SEGNALATI ALL'EDITORIAL BOARD

Gruppo A: A-13, A-15

Gruppo B: B-01, B-02, B-07, B-09, B-23

Gruppo C: C-28

Gruppo D: D-17

Gruppo E: E-09, E-13, E-14, E-22

Gruppo F: F-01, F-02

Gruppo G: G-13

FAR DI NECESSITÀ VIRTÙ: IL NOSTRO TENTATIVO IN EMOCITOMETRIA**A-01****M. Moretti, E. Delprete**

Laboratorio di Patologia Clinica Ospedale S. Croce Fano (PU) Zona Territoriale 3 ASUR Marche

Scopo del lavoro: Il Dipartimento dei Servizi della Zona Territoriale 3 comprende tre laboratori organizzati secondo il modello hub (Fano) and spoke (Fossombrone e Pergola). In tutte e tre i laboratori è presente il settore di emocitometria. Negli ultimi anni si è determinato un elevato turnover di dirigenti impiegati nel settore con potenziali ricadute negative sulla qualità delle prestazioni. Per questo la Direzione dell'Unità Operativa e i dirigenti coinvolti hanno individuato e avviato un percorso di riorganizzazione e ottimizzazione dell'attività. Gli elementi chiave per raggiungere l'obiettivo sono stati: un forte investimento nella formazione dei dirigenti, neoassunti o con attività prevalente in altri settori, e la condivisione della logica di gestione dell'esame emocromocitometrico. Il processo è stato supportato dal middleware DMS® (Dasit Management System).

Materiali e Metodi: La formazione ha coinvolto quattro dirigenti affiancati ai colleghi con esperienza nel settore di ematologia. In parallelo si è implementato e sviluppato il DMS®. In particolare le applicazioni su cui si è investito maggiormente, perché ritenute più utili per l'obiettivo fissato, sono state: la definizione e la condivisione di regole logiche comuni di validazione, la costruzione di una rete fra le tre strutture e la possibilità di archiviare/catalogare dati e immagini.

Risultati: Al momento i tre laboratori hanno regole comuni di validazione, d'azione e commento del campione garantendo così una buona standardizzazione del processo intra e interlaboratorio. La realizzazione di una rete geografica ci permette di neutralizzare il sito di validazione supportandoci in caso di carenza di personale ed è un ottimo ausilio per la consulenza a distanza. L'archivio di dati e immagini, la classificazione dei pazienti unitamente alla disponibilità di richiamare con semplicità queste informazioni sono elementi fondamentali nella formazione del personale e garantiscono un importante e aggiornato help da consultare e arricchire.

Discussione e Conclusioni: Il percorso intrapreso ci ha portato a creare un unico settore virtuale di ematologia ed ha formato condividendo conoscenze e competenze quattro dirigenti ora indipendenti nella gestione del campione ematologico aumentando in modo importante la flessibilità nella turnazione del personale con garanzia della qualità delle prestazioni. Il tutto è stato indubbiamente facilitato dalle funzioni del DMS® che ha contribuito significativamente a rendere tutte le fasi del processo più rapide e sicure. La necessità di riorganizzarsi da fonte di preoccupazione è diventata così stimolo e infine soddisfazione per avere raggiunto l'obiettivo migliorando lo spirito di gruppo dell'equipe scavalcando i rigidi schemi di settori separati e impermeabili.

IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE DI CELLULE NEOPLASTICHE NEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO**A-02****M.M. Ciriello, L. Calcagno, T. Callegari, M. Foco, C. Arfini**

Dipartimento Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera S.S. Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

Scopo del lavoro. La localizzazione meningea è un'importante e temibile complicanza in pazienti con linfoma B e T e leucosi acuta mieloide e linfoide. Recenti lavori indicano che l'analisi immunofenotipica in citometria a flusso dei campioni di liquido cefalorachidiano può aumentare l'efficienza di identificazione di coinvolgimento del sistema nervoso centrale, grazie all'elevata specificità e sensibilità del metodo. I campioni liquorali spesso sono paucicellulari e le poche cellule perdono rapidamente vitalità. Pertanto l'analisi dei campioni di liquor con sospetta localizzazione meningea richiede uno specifico protocollo metodologico che riguardi stoccaggio, trasporto, preparazione e analisi del campione. In questo lavoro descriviamo il metodo utilizzato presso il nostro laboratorio.

Materiali e Metodi. I campioni di liquor presentano spesso un numero estremamente basso di cellule che perdono rapidamente vitalità, quindi nel nostro laboratorio processiamo il campione il più presto possibile, massimo entro 1 ora dalla raccolta utilizzando, nel caso di sospetto linfoma, un approccio in 2 tempi: nel primo step prepariamo 2 tubi di screening: kappa/lambda/CD45/CD19 e CD5/CD20/CD45/CD3 o, alternativamente, CD3/CD20/CD45/CD10 in base alla conoscenza o meno di un fenotipo precedentemente individuato su linfonodo o midollo. Questo approccio nella maggior parte dei casi risulta sufficiente per rispondere al quesito clinico. Nei casi in cui è identificata una popolazione patologica passiamo al secondo step, usando un'appropriato pannello di reagenti al fine di completare la sospetta diagnosi. In caso di sospetta recidiva meningea di leucosi acuta utilizziamo un tubo contenente gli anticorpi selezionati per la malattia residua nello stesso paziente.

Risultati: Dal 2006 ad oggi abbiamo analizzato in citometria a flusso 52 campioni di liquor, riscontrando presenza di elementi neoplastici clonali in 7 casi (13,7%) e recidiva meningea in un caso di leucosi acuta mieloide (M1), dopo 5 anni da trapianto allogenico. Sette liquor positivi erano di pazienti con diagnosi di LNH o casi con lesioni sospette al SNC (diagnostica per immagini). In 6 casi era già stata fatta diagnosi di LNH e l'analisi citofluorimetrica ne ha sempre confermato il sottotipo. In tutti i casi studiati non era stata praticata profilassi intrarachide. L'analisi citologica del liquor, quando disponibile, ha dato sempre esito negativo. La cellularità liquorale era in media 46/μl (2-100/μl) determinata con doppia conta (in camera Nageotte e su ADVIA 2120i).

Conclusioni. L'analisi del liquor in citometria a flusso, per sospetto di localizzazione meningea di cellule neoplastiche, risulta molto sensibile e specifica. Il presupposto è l'esistenza di un appropriato e standardizzato setup strumentale accanto ad un team di operatori esperti. Le potenzialità della tecnica citofluorimetrica potranno ancora aumentare introducendo pannelli anticorpali a 6/8 colori, ottenendo livelli di sensibilità e specificità ancora più elevati. La ricerca di cellule neoplastiche liquorali in citometria a flusso deve senza dubbio affiancare la citologia convenzionale, molto specifica ma poco sensibile, soprattutto su campioni paucicellulari.

UTILITA' DEL PARAMETRO IPF (Frazione Immatura delle Piastrine) IN ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA**A-03****S. Pipitone¹, L. Ippolito¹, M. Bardi¹, G. Costantino¹, A. Barone², C. Gelmetti², M.T. Marino¹**¹U.O. Diagnostica Ematochimica, ²U.O. Oncoematologia Pediatrica - A.O. Universitaria Parma

Scopo del lavoro: Il parametro IPF fornito dai sistemi ematologici Sysmex XE-2100 quantifica le piastrine ad elevato contenuto di acido nucleico ovvero le Piastrine Reticolate, giovani, appena rilasciate dal midollo. Scopo del lavoro è stato di valutare, in pazienti pediatriche in chemioterapia per leucemie acute e tumori solidi, l'efficacia del parametro IPF come espressione della trombopoiesi midollare ed il suo possibile impiego allo scopo di ridurre o posporre le trasfusioni di concentrati piastrinici.

Materiali e Metodi: Sono stati seguiti 14 pazienti, di età tra 1 e 16 anni, in trattamento chemioterapico per patologie oncoematologiche (8 LAL, 1 LNH) e tumori solidi (1 seminoma cerebrale, 4 sarcomi). La variazione di conteggio PLT tra 2 controlli emocitometrici eseguiti entro un intervallo di 2 giorni è stata valutata rispetto al parametro IPF% al fine di individuare, da analisi Curva ROC, il cut-off predittivo di aumento, o diminuzione, del conteggio PLT. Lo studio è stato effettuato sui controlli con conteggio PLT < 100x10⁹/L (188 casi, di cui 63 con PLT < 30x10⁹/L)

Risultati: In 116 controlli (61.7%) l'emocromo eseguito entro 1 o 2 gg dal precedente aveva un conteggio PLT in diminuzione (Δ PLT Neg); i restanti 72 (38.3%) avevano PLT in aumento (Δ PLT Pos). Da analisi Curva ROC, un cut-off di IPF=6.7% nel primo emocromo è in grado di predire correttamente in 163 casi (86.7%) la variazione di conteggio PLT. 101 dei 116 controlli con "PLT NEG avevano infatti valore IPF < 6.7% nel primo emocromo, mentre 62 su 72 controlli con Δ PLT Pos avevano IPF \geq 6.7%. Tra le discordanze osservate alcune hanno motivazioni logiche: 7 controlli su 10 con Δ PLT Pos e IPF < 6.7% infatti si riferivano a emocromi post trasfusione PLT in cui il valore IPF è diminuito per diluizione delle PLT trasfuse e/o temporanea soppressione della produzione di trombopoietina. 13 controlli su 15 con Δ PLT NEG e IPF \geq 6.7% si riferivano solo a 2 dei 14 pazienti esaminati (1 tumore solido, 1 LAL). E' noto al riguardo che complicanze quali infezioni, sepsi, reazioni autoimmuni a farmaci possono modificare il turnover PLT e la potenzialità rigenerativa midollare.

Conclusioni: I risultati dello studio confermano che IPF è un parametro in grado di monitorare in modo semplice, veloce ed efficace il turnover piastrinico e la trombopoiesi midollare. In assenza di complicanze quali infezioni, sepsi, disordini emorragici nella storia clinica del paziente, il parametro può essere di valido supporto decisionale per posporre e ridurre, in corso di chemioterapia, le trasfusioni di concentrati piastrinici.

CONTEGGIO DELLE PIASTRINE CON L'ANALIZZATORE EMATOLOGICO UNICEL DXH800 COULTER CELLULAR ANALYSIS SYSTEM**A-04****C. Piccinini¹, B. Casolari¹, N. Di Gaetano², B. Biasioli¹**¹AOU Trieste, ²Instrumentation Laboratory

Premessa: L'accuratezza nel conteggio delle piastrine (PLT) è necessaria soprattutto nelle severe trombocitopenie di diversa origine per le quali è prevista l'applicazione di protocolli di trasfusione profilattica. Tuttavia, nonostante l'alta qualità raggiunta dalle performance degli analizzatori ematologici e le diverse tecnologie utilizzate (impedenza, ottica, fluorescenza, immunologia), l'accuratezza del conteggio delle PLT rimane ancora un problema a causa della presenza di fattori interferenti (frammenti cellulari, microciti, lisi incompleta dei GR, eritroblasti). È, quindi, importante conoscere le performance dei singoli analizzatori per un utilizzo ottimale dei dati da questi forniti.

Scopo del lavoro: Valutazione di sensibilità, accuratezza e precisione del conteggio piastrinico con il nuovo analizzatore ematologico UniCel DxH800 Coulter Cellular Analysis System, che utilizza il metodo impedenziometrico con Accucount, rispetto al metodo di riferimento ISLH/ICSH che prevede la valutazione citofluorimetrica con anticorpi monoclonali specifici (CD41/CD61).

Materiali e metodi: Sono stati esaminati 53 campioni prelevati in EDTAK₃ di pazienti ricoverati, affetti da diverse patologie, con conteggi di PLT da 5 a 940x10³/ μ L, processati entro 6 ore dal prelievo. L'analisi immunofenotipica è stata effettuata con citofluorimetro Epics XL Coulter utilizzando il metodo di riferimento succitato. Il conteggio dei GR è stato eseguito su LH750 con metodo impedenziometrico + Accucount. Analisi statistica mediante software MedCalc.

Risultati: L'analisi statistica dei campioni sull'intero range di conteggio evidenzia una retta di regressione con $y=1,01x+4$ ed $R^2=0,983$. I 12 campioni con conteggio di PLT < 20x10³/ μ L mostrano una retta di regressione con $y=1,03x+0,3$ ed $R^2=0,880$. L'analisi statistica secondo Bland-Altman mostra una differenza media tra i due metodi di 1,5x10³ PLT. L'analisi statistica secondo Passing-Bablok non evidenzia scostamenti dalla linearità ($p>0,1$). I campioni con conteggio di PLT > 500x10³/ μ L evidenziano una retta di regressione con $y=1,05x+13$ con $R^2=0,94$, una differenza media tra i due metodi di 29 ed una buona linearità.

Discussione e conclusioni: Diverse esperienze dimostrano che, contrariamente a quanto sostenuto in passato, il metodo impedenziometrico per il conteggio delle PLT non è inferiore a quello ottico. I nostri dati dimostrano che l'analizzatore Coulter DxH800, che utilizza il metodo impedenziometrico + Accucount, offre ottime performance in termini di linearità e correlazione col metodo di riferimento sia in presenza di spiccata piastrinosi che nei campioni fortemente piastrinopenici. Infatti, tutti i campioni con conteggio PLT < 20.000/ μ L sono stati correttamente identificati come potenzialmente candidati alla trasfusione piastrinica.

REPERTAIONE INCIDENTALE DI EMOGLOBINOPATIE NEL CORSO DELLA DETERMINAZIONE ROUTINARIA IN HPLC DELL'EMOGLOBINA GLICATA

A-05

M. Ramon, M. Forni, A. Giomo, N. Santoro, L. De Valentin, R. Turrini, D. Falconi, G. Piaserico

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia ULSS n° 8 Asolo (TV)

Introduzione: La determinazione della componente glicosilata dell'emoglobina costituisce uno dei test principe nel monitoraggio del compenso glicemico a lungo termine ed è realizzata, nella maggior parte dei laboratori, in HPLC. Le moderne strumentazioni per cromatografia offrono, infatti, la possibilità di processare un gran numero di campioni con tempi e costi contenuti, permettendo di evidenziare incidentalmente la presenza di emoglobine anomale.

Scopo: La ricerca, nata dal lavoro quotidiano della nostra struttura, si è proposta di valutare la frequenza dei reperti occasionali di trait talassemici e varianti strutturali dell'emoglobina nella popolazione afferente ai servizi dell'ULSS per il monitoraggio diabetico, allo scopo sia di ottenere maggiori informazioni sulla diffusione delle emoglobinopatie nel nostro territorio sia di valutare l'opportunità di introdurre metodi alternativi per la determinazione dell'HbA_{1c} in presenza di varianti interferenti.

Materiali e Metodi: Nel periodo ottobre 2006 - settembre 2007 sono stati monitorati con la determinazione in HPLC dell'emoglobina glicata 6857 pazienti, utilizzando la strumentazione VARIANT II HbA₂/HbA_{1c} Dual Program (Bio-Rad Laboratories) ed il Method A1c. Di seguito e fino al mese di settembre 2008, sono stati studiati 7232 pazienti con HA-8160 (Menarini) utilizzando la modalità "diabete-talassemia HbA_{1c}/HbA₂".

Risultati: Sono stati individuati complessivamente 80 reperti incidentali d'emoglobinopatia, di cui 43 quadri di trait talassemico (54%) e 37 varianti strutturali (46%). In particolare, i pazienti individuati con VARIANT II sono stati 8 (0.11% di tutti i soggetti monitorati nel primo anno di studio), 2 portatori di trait talassemico e 6 con variante strutturale. HA 8160-Menarini ha permesso di evidenziare 72 portatori (0.99% dei pazienti studiati nel secondo anno), 41 con trait talassemico e 31 con variante strutturale che in due casi ha interferito con HbA_{1c} impedendone la quantificazione.

Discussione e conclusioni: I dati ottenuti dimostrano che la determinazione in HPLC dell'emoglobina glicata rappresenta un potenziale strumento di screening per lo studio delle emoglobinopatie nella popolazione afferente ai nostri servizi di Laboratorio. L'HPLC costituisce un metodo adatto al nostro ampio bacino d'utenza, ma in futuro potrà rendersi necessaria l'adozione di test alternativi per i pazienti diabetici portatori di varianti strutturali interferenti con HbA_{1c}.

DETERMINAZIONE IN HPLC DI VARIANTI STRUTTURALI DELL'EMOGLOBINA IN PAZIENTI DELL'ULSS N°8 ASOLO -REGIONE VENETO

A-06

M. Ramon¹, M. Forni¹, G. Ivaldi², G. Piaserico¹

¹Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia ULSS n° 8 Asolo (TV)

²Laboratorio di Genetica – Settore Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova

Introduzione: Le varianti strutturali dell'emoglobina, grazie ai flussi migratori delle popolazioni e ai correlati cambiamenti sociali, presentano un quadro di distribuzione sempre più variegato, essendo oggi identificate anche in aree ritenute tradizionalmente non endemiche.

Scopo: La ricerca si è proposta di valutare la frequenza e la tipologia delle varianti strutturali dell'emoglobina nella popolazione afferente ai servizi del nostro laboratorio.

Materiali e Metodi: Nel periodo 2006-2008, sono stati studiati in HPLC 1578 pazienti (981 femmine e 597 maschi, 1205 italiani e 373 stranieri), tra i quali 1498 con richiesta specifica di screening dell'assetto emoglobinico e 80 con anomalie cromatografiche evidenziate in primis durante la determinazione dell'HbA_{1c} ed avviati quindi all'iter diagnostico di approfondimento. Nel primo anno di studio è stata utilizzata la strumentazione VARIANT II HbA₂/HbA_{1c} Dual Program (Bio-Rad Laboratories) con l'applicazione del Method A_{1c} per la determinazione dell'emoglobina glicata e del β-Thal Method per lo studio delle varianti. Di seguito è stato introdotto HA-8160 (Menarini) utilizzando la modalità "diabete-talassemia HbA_{1c}/HbA₂" e usufruendo del servizio telematico di second opinion per l'interpretazione dei cromatogrammi. Le varianti HbS sono state confermate con test di sickling.

Risultati: Sono stati evidenziati complessivamente 88 portatori di variante strutturale, 51 appartenenti al gruppo di pazienti con richiesta mirata e 37 reperti "incidentali" nel corso del monitoraggio del compenso glicemico. Tra le varianti comuni, sono stati riscontrati 39 casi di HbS (45%), 6 dei quali in omozigosi, 30 probabili HbD Punjab (34%), 8 HbC (9%), di cui un'omozigosi. In 8 casi (9%) non è stato possibile giungere ad un'identificazione, seppur presuntiva, dei picchi cromatografici anomali. Tra i reperti occasionali, sono stati identificati 20 portatori di sospetta HbD Punjab (54%), 10 HbS (27%), 1 HbC (3%) e 6 varianti di ndd (16%). HbS, variante più frequente nel gruppo dei pazienti stranieri, è stata riscontrata nell'11% dei pazienti italiani preceduta da HbD Punjab con il 78% dei casi.

Discussione e conclusioni: I dati ottenuti permettono di inserire la nostra area nel contesto epidemiologico italiano ed europeo. Alla luce dei numerosi reperti occasionali, possiamo tuttavia ritenere che il "fenomeno varianti" sia sottostimato, non solo tra i pazienti stranieri ma particolarmente tra quelli italiani e autoctoni trevigiani per i quali HbD Punjab, se confermata con test molecolari, si delinea marker caratteristico non ancora completamente esplorato nelle sue implicazioni cliniche.

I CELL POPULATION DATA SU UNICEL DXH 800 CELLULAR ANALYSIS SYSTEM NELLA VALUTAZIONE DELLA DISPLASIA GRANULOCIARIA

A-07

C. Piccinini¹, B. Casolari¹, N. Di Gaetano², B. Biasioli¹

¹DAI di Medicina di Laboratorio AOU Trieste, ²Instrumentation Laboratory

Premessa: La displasia dei granulociti neutrofili (GN) è presente in diverse situazioni reversibili (stati carenziali, terapie) e non reversibili (MDS, altre malattie ematologiche). Tale alterazione morfologica dev'essere sempre segnalata e descritta nel referto del laboratorio perché è un elemento essenziale del corretto iter diagnostico. Tra gli analizzatori ematologici, quelli più studiati per la loro capacità di segnalare la presenza di displasia granulocitaria sono i Coulter IL della serie LH 700 che, grazie alla tecnologia VCS utilizzata per lo studio delle sottopopolazioni leucocitarie ed alla traduzione in parametri numerici, chiamati Cell Population Data (CPD), dei valori medi e di deviazione standard di Volume, Conduttività e Scatter, valutati su ogni cellula, sono in grado di evidenziare, in modo oggettivo, la differenza tra i campioni normali e quelli displastici. Esistono numerose evidenze che la displasia granulocitaria, di varia origine, è caratterizzata da riduzione di CM e di SM.

Scopo del lavoro: Verificare il comportamento dei CPD forniti dall'analizzatore ematologico UniCel DxH 800 Coulter Cellular Analysis nella displasia dei GN. Tale nuovo strumento, infatti, a differenza degli altri succitati, utilizza, oltre alla determinazione di Volume e Conduttività, 5 Scatter di luce laser rilevati a diverse angolazioni (da 0° a 43°).

Materiali e metodi: Sono stati analizzati 68 campioni, prelevati in EDTA K₂, con presenza di displasia granulocitaria evidenziata al microscopio ottico (MO). I CPD di questi campioni sono stati confrontati con quelli di una popolazione di riferimento che non presentava alterazioni morfologiche e/o numeriche. Analisi statistica effettuata con software Med Calc.

Risultati: In tutti i campioni esaminati risultano ridotti CM (148 vs 151) e tre dei 5 SM: a basso angolo (LALS), ad angolo medio-basso (LMALS), ad angolo medio (MALS). L'analisi delle curve ROC suggerisce i seguenti cut off: CM≤148 (AUC=0,832; Sens.=73,3; Spec.=86,2), LALS≤167 (AUC=0,890; Sens.=82,1; Spec.=86,7), LMALS≤130 (AUC=0,927; Sens.=82,1; Spec.=92,3), MALS≤136 (AUC=0,900; Sens.=74,6; Spec.=92,8). Interessanti anche i dati sull'eterogeneità volumetrica, già segnalati in letteratura: V SD≥19,58 (AUC=0,973; Sens.=89,6; Spec.=84,6).

Discussione e conclusioni: Questi dati preliminari mostrano che i CPD dell'analizzatore segnalano la displasia granulocitaria presentando lo stesso comportamento evidenziato sugli altri analizzatori Coulter. Ciò conferma la correttezza del percorso intrapreso e suggerisce che l'utilizzo di 5 scatter di luce laser, invece che di uno solo, potrebbe essere utile nell'evidenziare meglio diversi aspetti della morfologia cellulare e nel riconoscere diversi tipi displasia.

IL CONTEGGIO DEGLI ERITROBLASTI CON L'ANALIZZATORE EMATOLOGICO UNICEL DXH800 COULTER CELLULAR ANALYSIS SYSTEM

A-08

B. Casolari¹, C. Piccinini¹, N. Di Gaetano², B. Biasioli¹

¹AOU Trieste, ²Instrumentation Laboratory

Premessa: Il riconoscimento nel sangue periferico degli eritroblasti (NRBC) è uno dei problemi più importanti in Ematologia automatizzata. Infatti la loro presenza nel sangue periferico, trascorso il periodo neonatale, riflette sempre la presenza di una condizione patologica, ematologica e non, e di stress emopoietico e, in alcune patologie, il peggioramento della prognosi. Dal punto di vista tecnico, riconoscimento e conteggio degli NRBC possono essere difficili a causa della loro eterogeneità morfologica; la loro presenza determina inaccuratezza del conteggio dei globuli bianchi totali (WBC). Importanti, quindi, risultano la sensibilità, l'accuratezza e la precisione del conteggio degli NRBC in automazione così come la correzione automatica del conteggio dei WBC.

Scopo del lavoro: Valutazione della performance del conteggio degli NRBC ottenuta col nuovo analizzatore ematologico Unicel DxH800 rispetto al metodo di riferimento citofluorimetrico ed alla revisione microscopica. L'analizzatore, che effettua il conteggio degli NRBC su tutti i campioni, utilizza un canale analitico dedicato ed un reagente che lisa selettivamente gli eritrociti. Questa tecnologia prevede 7 misurazioni contemporanee per ogni cellula (Volume, Conduttività e 5 rilevazioni a differenti angoli di diffrazione della luce laser).

Materiali e metodi: Sono stati esaminati, entro 6 ore dal prelievo, 30 campioni di sangue periferico prelevati in EDTA K₂, nei quali è stata evidenziata la presenza di NRBC alla revisione microscopica (MO) effettuata secondo protocollo CLSI H20-A. L'analisi immunofenotipica è stata effettuata con citofluorimetro Coulter Epics XL utilizzando gli anticorpi monoclonali DRAQ5/CD45. Analisi statistica effettuata con software MedCalc.

Risultati: I campioni esaminati presentavano conteggi di NRBC al citofluorimetro da 0,02 a 8,5/100 WBC. L'analisi statistica evidenzia una buona correlazione tra il conteggio degli NRBC effettuato dall'analizzatore DxH800 ed i metodi di riferimento evidenziando, rispetto al metodo citofluorimetrico, una correlazione di 0,982 con slope di 0,9 e, rispetto al MO, una correlazione di 0,911 e slope di 1,2. L'analisi statistica secondo Bland-Altman evidenzia un'ottima performance dell'analizzatore DxH800 con media delle differenze rispetto al citofluorimetro di 0,05 e 2SD=0,8.

Conclusioni: I dati dimostrano un'ottima performance di conteggio dell'analizzatore sia nel confronto col metodo tradizionale di riferimento (MO) che col metodo citofluorimetrico. I dati sono molto buoni anche a valori bassi di conteggio degli NRBC sovrapponendo la sensibilità analitica a quella clinica di 1 NRBC/100WBC. Questo risultato è una risposta tecnologica importante alle esigenze della moderna Medicina di Laboratorio.

UTILITA' CLINICA DEL PARAMETRO PIASTRINICO IPF% NELL' INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO DELLE PIASTRINOSI

A-09

D. Campioli, A.M. Ottomano, F. Corcetti, A. Lorenzo

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

Scopo del lavoro. Il sistema ematologico TOA-Sysmex XE-2100 fornisce una serie di parametri piastrinici tra cui: Immature Platelet Fraction (IPF %) che esprime la percentuale di piastrine immature rispetto al conteggio piastrinico totale ed è oggetto di studio quale indicatore del turn-over trombocipoietico. Seppure debba essere considerato un parametro di ricerca riveste interesse in diversi ambiti clinici che vanno dalle piastrinopenie alle condizioni trombofiliche, al controllo di terapie antiplastriniche. Scopo del nostro lavoro è stato valutare l'utilità clinica di questo parametro nell'inquadramento diagnostico delle piastrinosi, in particolare nella loro possibile suddivisione in forme primarie o secondarie.

Materiali e metodi: Abbiamo valutato 90 esami emocromocitometrici con conteggio piastrinico $> 450 \times 10^3/\mu\text{l}$ provenienti dai reparti del Policlinico di Modena eseguiti sul sistema ematologico TOA-SYSMEX XE-2100, secondo le modalità standard del nostro laboratorio (provetta con K3EDTA, esaminate entro 4 ore dall'accettazione del campione). In base alle notizie disponibili sul nostro sistema informativo di laboratorio (SIL) i campioni sono stati classificati come piastrinosi primitive in caso di patologie mieloproliferative (30 campioni) o secondarie in caso di patologie non primitivamente mieloproliferative (60 campioni). Dalla casistica sono stati esclusi i casi di cui non si disponeva di notizie cliniche. Sono state valutate per IPF% e altri parametri piastrinici (PLT, PDW, MPV, P-LCR) le distribuzioni dei valori, il confronto delle distribuzioni nei due gruppi con test di Mann-Whitney, il potere discriminante dei diversi parametri mediante confronto delle curve ROC.

Risultati. IPF% è il parametro che maggiormente differenzia ($p < 0.0001$ al test di Mann-Whitney) i due gruppi di trombocitosi. A ulteriore conferma del potere discriminante di IPF%, la differenza dell' Area Sotto la Curva (AUC) della curva ROC di IPF% rispetto a tutti gli altri parametri ha significatività con $p < 0.0001$

Discussione e conclusioni. IPF% si dimostra un parametro molto utile nell'inquadramento diagnostico di una piastrinosi. Ponendo un cut-off a 8.5 si ottiene una forte capacità di differenziare tra i due gruppi di trombocitosi; un risultato superiore a questo limite permette di escludere una piastrinosi secondaria con un elevato Valore Predittivo Positivo. Viceversa un basso valore di IPF% non permette di escludere una patologia mieloproliferativa in quanto il parametro mostra una variabilità verosimilmente legata a variabili della patologia come forma clinica o fase evolutiva della patologia stessa, eventuale terapia in atto o altre variabili al momento non conosciute.

ANOMALIE DEL LEUCOCITOGRAMMA: SOSPETTO DEFICIT DI MIELOPEROSSIDASI

A-10

V. Brescia, A. Mileti, M. Tampoia, A. Losito, G. Urso, A. Lopello, A. Verna, F. Di Serio

Patologia Clinica I, Policlinico Bari

La Mieloperossidasi (MPO) è una eme-proteina dei granuli primari azzurrofilici dei G.Neutrofilici e dei Monociti. E' il principale marcatore delle cellule mieloidi. In letteratura sono descritti stati di deficit congenito e acquisito.

Scopo del lavoro Valutazione della neutropenia e linfomonocitosi per sospetto deficit di MPO su ADVIA2120 (Siemens).

Materiali e Metodi. Sono stati valutati n 3 campioni di sangue pervenuti presso la Patologia Clinica I del Policlinico di Bari nel 2009. I campioni sono stati analizzati su ADVIA 2120 e su CELL-DYN Sapphire (Abbot) per confronto dei conteggi e dei citogrammi. E' stata eseguita valutazione in M.O. dello striscio di sangue periferico con colorazione M.G.G., per la conta cellulare differenziale, e con colorazione per la M.P.O. per la valutazione dei G.Neutrofilici. Inoltre è stato eseguito immunofenotipo MPO per definire l'eziopatogenesi.

Risultati. vedi Tabella

Conclusioni. I nostri dati evidenziano che le informazioni fornite sui campioni dall' ADVIA 2120, per la metodologia utilizzata, possono far sospettare un deficit di MPO. Tuttavia per l'inquadramento diagnostico (forme acquisite) è stato necessario ricorrere a test di secondo livello (citochimica e immunofenotipo)

Bibliografia. Dale DC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. Blood. Aug 2008

test	ADVIA 2120 Siemens			CELL- DYN Sapphire Abbot			M.O.		
	Campione 1	Campione2	Campione3	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 1	Campione 2	Campione 3
WBC 10 ⁹ /μL	5.80	13.96	6.68	5.62	13.80	6.59			
# G.Neutrofilici	0.05 (0.8%)	0.25 (1.8%)	0.06 (0.9%)	2.76 (49.1%)	9.21 (66.6%)	2.87 (43.5%)	50 %	64%	48%
# Linfociti	2.11 (36.4%)	5.28 (25.2%)	5.40 (39.7%)	2.18 (38.9%)	3.66 (26.5%)	2.63 (39.9%)	40%	24%	40%
# Monociti	1.92 (33.2%)	8.14 (55.2%)	0.72 (0.5%)	0.40 (7.16%)	0.68 (4.93%)	0.55 (8.40%)	8%	10%	6%
# G.Eosinofili	0.21 (3.5%)	0.22 (1.6%)	0.46 (6.9%)	0.21 (3.8%)	0.21 (1.55%)	0.51 (7.74%)	2%	2%	6%
# G.Basofili	0.02 (0.4%)	0.07 (0.5%)	0.04 (0.6%)	0.05 (0.9%)	0.06 (0.5%)	0.02 (0.4%)	0 %	0 %	0 %
LUC	1.48 (25.6%)	2.19 (15.7%)	3.43 (51.4%)						

STABILITÀ DEL LEUCOCITOGRAMMA IN FUNZIONE DEL TEMPO E DELLA TEMPERATURA DI CONSERVAZIONE

A-11

V. Brescia, A. Mileti, M. Tampoia, A. Losito, G. Urso, A. Lopello, A. Verna, F. Di Serio

Patologia Clinica I, Policlinico Bari

Il leucocitogramma differenziale è influenzato dal tempo e dalla temperatura di conservazione.

Scopo del lavoro. Verifica del mantenimento dei conteggi ematologici di campioni conservati a t. ambiente.

Materiali e Metodi. Sono stati valutati i referti di n.30 emocromi mantenuti a t. ambiente (18-22°C) fino a 72 h. La conta e la differenziazione dei leucociti è stata eseguita su ADVIA 2120 (Siemens), metodologia ottica ed enzimatica (MPO). L'instabilità è stata espressa come % di scostamento dei risultati ottenuti al tempo 0. La massima instabilità accettabile è stata valutata, sec. standard WHO/DIL/LAB/99.1 Rev2, pari a 1/2 dell'errore totale analitico intralaboratorio (TEa)

Risultati

	TEa	Scostamento % medio (n.30 campioni)							
		4 h	6 h	8 h	10 h	14 h	24 h	48 h	72 h
WBCx10 ³ μL	9.7%	0.02%	-0.26%	0.68%	1.08%	0.37%	-1.31%	-1.91%	1.64%
# G.Neutrofilii	12.1%	0.44%	-0.14%	1.1%	1.36%	1.63%	3.67%	3.34%	6.52%
# Linfociti	11.1%	0.12%	0.16%	0.28%	0.51%	-0.37%	-6.8%	-10.9%	-20.8%
# Monociti	22.0%	-3.13%	-0.95%	4.66%	3.47%	2.27%	-14.2%	-25.9%	-20.3%

Discussione. La riorganizzazione del laboratorio con attività centralizzate può determinare l'arrivo di emocromi a distanza di tempo dal prelievo. Ogni laboratorio dovrebbe conoscere e fornire le specifiche preanalitiche in funzione della metodologia in uso. Il confronto con TEa permette una valutazione "pesata" e biologicamente rilevante delle modifiche intervenute nel leucocitogramma.

Bibliografia

I.M. Buttarello. Quality specification in haematology: the automated blood cell count Clinica Chimica Acta 346.2004,45-54

CONTA AUTOMATICA DEGLI ERITROBLASTI E CONFRONTO CON IL METODO DI RIFERIMENTO

A-12

L. Simoni, C. Maggi, F. Sozzani, G. Ballabio, N. Bassani¹, E.M. Biganzoli¹

Med. Laboratorio 1, Statistica Medica e Biometria¹, Istituto Nazionale Tumori, Milano

Scopo del lavoro: Verificare l'attendibilità dei valori numerici di nRBC forniti dall' ADVIA 2120 SIEMENS mediante valutazione di confronto con il metodo di riferimento in microscopia ottica.

Materiali e Metodi: Il metodo nRBC ADVIA fornisce la conta di nRBC quando nRBC/μl sono ≥ 200 o $\geq 2\%$ con almeno 3000 WB/μl. Dalla routine, processata entro 2 ore dal prelievo, sono stati selezionati: 168 campioni con allarme nRBC+ e presenza di nRBC, 100 campioni controllo, 50 con "0" nRBC contati e 50 con "Blank" (casella vuota). Su tutti è stato eseguito il conteggio al microscopio. L'attendibilità del metodo nRBC ADVIA in termini di accuratezza (non-distorsione) e precisione è stata valutata su base statistica utilizzando un modello di regressione con errore moltiplicativo tramite trasformazione logaritmica delle misure. Sono fornite le stime dei minimi quadrati ordinari (OLS) e le stime non parametriche con il metodo di Passing e Bablok (1983) (PB) senza assumere la misura di riferimento priva di errore. In aggiunta, è stato globalmente valutato il coefficiente di concordanza e correlazione (CCC) secondo Lin (1989) e la versione modificata secondo St Laurent (1998) per il confronto con uno standard di riferimento CCCrs. Per le analisi è stato utilizzato software R e libreria "agreement" di Frascati, Biganzoli, Cesana (2009).

Risultati: Sui 168 campioni con allarme + e presenza di nRBC, 31 non sono risultati positivi al successivo esame di riferimento microscopico (Pfp=0.18, intervallo di confidenza al 95%, IC95%=0.13-0.25). Il grafico bivariato di concordanza dei metodi sulla scala di misura originale indica dispersione crescente al crescere dei valori misurati suggerendo una struttura di errore di tipo moltiplicativo. Le stime (e relativi IC95%) del modello $\log Y = a + b \cdot \log X$: aOLS=0.41 (0.24-0.59); aPB=0.085 (0.013-0.14); bOLS=0.75 (0.67-0.83); bPB=0.85 (0.78-0.93), evidenziano possibile scostamento sistematico di tipo proporzionale delle misure del metodo ADVIA rispetto al riferimento microscopico, con sovrastima a bassi valori di misura e sottostima ad alti. L'imprecisione residua appare elevata, anche se da rivalutare sotto adeguate ipotesi di imprecisione relativa al metodo di riferimento. La stima di CCC=0.855 e del relativo indice corretto per lo standard di riferimento CCCrf=0.797 indicano concordanza non elevata da rivalutare in relazione a specifici obiettivi analitici/clinici. I campioni senza allarme nRBC+ si sono confermati tutti negativi al microscopio.

Conclusioni: La conta in automatico degli nRBC è un valido aiuto ma la verifica microscopica del dato strumentale positivo rimane fondamentale prima della sua refertazione. Miglioramenti del metodo e osservazioni di confronto con opportuni target clinici sono necessari.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO, IMPRECISIONE E INACCURATEZZA DEGLI INDICI PIASTRINICI MPV e PDW DEGLI ANALIZZATORI EMATOLOGICI

A-13

P. Doretto, P. Bulian, P. Cappelletti, B. Biasioli, M. Buttarello, B. Casolari, A. Cenci, G. Da Rin, C. Feruglio, C. Maconi, V. Miconi, L. Pasini, C. Piccinini, E. Piva, F. Siviero

Gruppo di Studio Ematologia SIMeL (GdS E)

Scopo del lavoro. L'attuale interesse per MPV (volume piastrinico medio) e in misura minore per PDW (ampiezza della distribuzione degli indici piastrinici) è legato al loro possibile utilizzo clinico nella valutazione dei disturbi della megacariocitopenia e nella valutazione del rischio emorragico e trombotico. Sono stati individuati gli intervalli di riferimento e valutati l'imprecisione e l'inaccuratezza di tali parametri su 5 strumenti con tecnologia differente: CD 4000 (Abbott), LH-750 (Coulter), PENTRA 120 (HORIBA-ABX), XE 2100 (Dasit) e ADVIA 120 (Siemens).

Materiali e Metodi. 139 campioni di sangue periferico prelevato in EDTA da soggetti normali (n. 139, 31% maschi e 69% femmine) e 206 patologici sono stati analizzati in duplicato entro 6 ore dal prelievo su ciascun analizzatore. Gli intervalli di riferimento sono stati calcolati con metodo non parametrico considerando l'intervallo centrale tra i percentili 2.5 e 97.5. La precisione nella serie è stata calcolata con ANOVA, l'accuratezza è stata valutata col grafico bias plot con calcolo della differenza media rispetto al valore medio dei 5 strumenti (4 strumenti per PDW).

Risultati. Gli intervalli di riferimento presentano differenze significative tra i vari strumenti sia per MPV (CD 4000 7.7-11.0, LH-750 7.9-11.3, PENTRA 7.6-10.0, XE 2100 9.8-12.6 e ADVIA 7.2-10.4, unità fL) che per PDW (CD 4000 16.0-17.2, LH-750 15.6-17.5, PENTRA 12.5-20.0, XE 2100 11.0-16.9 e ADVIA 46.4-68.5, unità %). L'imprecisione (CV%) per MPV varia da 1.8% a 3.7%, per PDW da 2.0% a 7.3%. I bias plot mostrano per MPV una buona concordanza con differenze dalla media di consenso sempre inferiori a 2 femtolitri e per 4 strumenti inferiori ad 1. Le differenze tra PDW e media di consenso (a 4 strumenti) sono mediamente inferiori a 2%, ma ADVIA si discosta notevolmente (42% di differenza media).

Discussione e Conclusioni. Gli intervalli di riferimento per MPV e PDW sono strumento dipendenti e riflettono la diversità dei metodi di misura (principio analitico e calcolo dei risultati). L'imprecisione è bassa, particolarmente per MPV. L'inaccuratezza, per quanto nei limiti di accettabilità, riflette la mancanza di un metodo di riferimento e di una standardizzazione del metodo di misura. I risultati della ricerca confermano quanto sostenuto dalle Linee Guida per il Referto Ematologico del GdS E SIMeL, relativamente a MPV e PDW.

DIAGNOSTICA DIFFERENZIALE DI ANEMIA EMOLITICA

A-14

P. Doretto, P. D'Altoè, P. Cappelletti

Patologia Clinica, DML, AOSMA Pordenone

Scopo del lavoro. Il pronto riconoscimento di una anemia emolitica è essenziale sul piano clinico e si basa sia su criteri clinico-anamnestici che laboratoristici in grado di valutare modalità d'insorgenza, tipo, gravità e compenso all'emolisi e successivamente se l'emolisi è da difetto intraglobulare (difetti congeniti di membrana o enzimopatici, emoglobinuria parossistica notturna) o extraglobulare (disordini acquisiti immunologici e non). Scopo del lavoro è valutare il work-up diagnostico di un paziente ricoverato in un reparto internistico per una severa anemia emolitica.

Materiali e Metodi. La paziente di aa. 61 giunge all'osservazione clinica per astenia da un mese, in peggioramento, con dispnea da sforzo, disuria, pollachiuria ed urine ipercromiche. Al momento del ricovero l'esame emocromocitometrico mostrava WBC 3440/ μ L, Hb 4.3 g/dL, MCV 98.3 fL, Plt 238000/ μ L. Obiettivamente pallore e splenomegalia. La positività ad alto titolo del test di Coombs diretto (IgG e C3d) e indiretto eseguito per valutare la compatibilità trasfusionale faceva porre diagnosi presuntiva di anemia emolitica autoimmune (AIHA) e veniva intrapreso l'iter diagnostico appropriato (conferma emolisi, tipo di anticorpo, forma idiopatica o secondaria).

Risultati. Positivi i segni di emolisi (LDH 1300 U/L, aptoglobina <7 mg/dL, bilirubina totale e diretta 4.9 e 1.0 mg/dL, striscio periferico: anisocitosi e anisocromia con emazie policromasiche ed alcuni eritroblasti, reticolociti 225800/ μ L), presenti crioagglutinine, β 2microglobulina 3.2 μ g/mL, proteinuria 1.94 g/24h, PCR 1.7mg/dL, positivi gli autoanticorpi ANA (1:2560) a morfologia omogenea e gli anti tireoglobulina (170 IU/mL), sierologia infettiva negativa per HCV, HBV, parvovirus B19, borrelia, toxoplasmosi, micoplasma, legionella, positiva per CMV IgG, border line per clamidia ed EBV anti VCA IgM. TAC ed ecografia addome negative per lesioni linfoproliferative, confermata la splenomegalia. Aspirato midollare negativo per infiltrazione, compatibile con anemia rigenerativa. Pur in assenza di sierosite, chiari segni cutanei di vasculite e storia di artrite, la presenza di criteri diagnostici quali ANA positivi ad alto titolo, interessamento renale, leucopenia e anemia emolitica autoimmune faceva porre diagnosi di oligo LES con AIHA.

Discussione e Conclusioni. Il corretto inquadramento di un'anemia emolitica autoimmune richiede un approccio clinico sinergico con quello diagnostico nel quale il laboratorio in tutti i suoi aspetti specialistici si integri con la clinica. In particolare quando AIHA è il primo sintomo, vanno scrupolosamente indagate le possibili malattie correlate, ricercando la presenza di neoplasie in particolare linfoproliferative, malattie autoimmuni e immunodeficienti e di antigeni e anticorpi di malattie infettive riconosciute come possibili cause di AIHA.

VALUTAZIONE CITOFLUORIMETRICA DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA NEL MIELOMA MULTIPLO

A-15

R. Pica, F. Bottan, M. Ruggeri, F. Pauselli

U. O. D. Medicina di Laboratorio, A. O. San Giovanni-Addolorata, Roma

Scopo del lavoro. In passato la citofluorimetria (CFM) ha avuto un ruolo molto marginale nella diagnosi e nel monitoraggio del mieloma multiplo (MM). Recentemente l'identificazione di caratteristiche immunofenotipiche peculiari della plasmacellula mielomatosa e la disponibilità di strumenti a 6 fluorescenze hanno aperto nuove prospettive, che ci proponiamo di illustrare con un esempio pratico, all'applicazione della CFM in tale ambito diagnostico.

Materiali e metodi. Per la valutazione della malattia minima residua (MMR) nel MM abbiamo adottato la metodica che segue: 100 µL di agoaspirato midollare prelevato con EDTA e diluito con PBS per ottenere una concentrazione ottimale di 10000 cellule/µL sono dispensati in due provette contenenti combinazioni di anticorpi monoclonali per i seguenti determinanti antigenici: CD138 CD38 CD45 CD56 CD117 CD19 e CD28 CD38 CD45 CD56 CD117 CD33 CD20. Dopo 15' di incubazione, i preparati sono lisati e fissati con 2ml di BD FACS LYSING SOLUTION per 10'. Dopo centrifugazione a 1700 gpm per 5' il sedimento è risospeso in 0,5 ml di PBS per la lettura. La lettura viene eseguita su citofluorimetro BD FACSCantoII a 6 fluorescenze. Acquisendo circa 1000000 di eventi per provetta è possibile misurare l'eventuale MMR con una sensibilità dello 0,01%. I dati sono acquisiti e analizzati con software FACSDIVA. Se l'analisi evidenzia la presenza di plasmacellule con immunofenotipo atipico, viene ulteriormente indagata l'espressione delle catene leggere intracellulari e dell'antigene di superficie CD200.

Risultati. Nell'esempio proposto, l'esame CFM di un campione di agoaspirato prelevato da un paziente in trattamento con MM IgGk, del tutto negativo per la presenza di plasmacellule all'osservazione microscopica, ha consentito la identificazione di una minima quantità di plasmacellule CD138+ (0,2% delle cellule nucleate), metà delle quali (0,1%) con immunofenotipo patologico CD38 ± CD56+ CD117+ CD28+ CD200+ CD19- CD45-. La ricerca delle catene leggere intracitoplasmatiche ha evidenziato inoltre con chiarezza la natura clonale KAPPA della sottopopolazione patologica CD56+ e la policlonalità delle plasmacellule CD56-.

Discussione e conclusioni. La CFM multiparametrica a 6 colori permette di evidenziare con estrema sensibilità e specificità minime quantità di plasmacellule patologiche e si propone come il più valido strumento di valutazione della risposta terapeutica nel MM attualmente disponibile. L'accertamento CFM della remissione completa di malattia è di vitale importanza per i pazienti candidati al trapianto autologo.

UN CASO DI DOPPIA ETEROZIGOSI Hb S/C: QUANDO IL PATOLOGO ORIENTA IL CLINICO

A-16

M. Mercadanti, A. Caleffi, M.T. Marino

U.O. Diagnostica Emato-chimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Parma

Scopo: Le emoglobinopatie, in particolare le varianti strutturali, in costante aumento, in parte legato ai flussi migratori, costituiscono una patologia emergente che può interessare anche la medicina d'urgenza. Lo scopo del lavoro è quello di riportare un caso che costituisce un esempio emblematico in tal senso.

Materiali e metodi: Maschio di 25 anni, di razza nera, giunto al pronto soccorso del nostro ospedale nel gennaio 2008, per addominalgia. L'emocromo è stato eseguito su XE-2100 (Sysmex), lo screening per emoglobinopatie è stato condotto in HPLC (Variant II, Dual Kit, Bio-Rad); i tests di conferma comprendevano test di falcizzazione con metabisolfito di sodio, migrazione elettroforetica a pH alcalino ed acido.

Risultati: L'emocromo mostrava: globuli bianchi $13.62 \times 10^3/\mu\text{L}$, emazie $3.46 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 11.8 g/dl, MCV 96.9 fl, MCH 34 pg, MCHC 35.1 g/dl, piastrine $281 \times 10^3/\mu\text{L}$. Segnalazioni strumentali di sospetto inducevano il controllo microscopico dello striscio di sangue periferico. La formula leucocitaria era nei limiti, la serie rossa presentava eritroblasti (79%), anisocitosi, emazie a bersaglio e rare emazie a falce. Nel sospetto di una emoglobinopatia emolitica veniva suggerita la valutazione dell'assetto emoglobinico al medico del PS, che riferiva di una intensa addominalgia nel paziente rientrato da 15 giorni dal Ghana, con anamnesi positiva per epigastralgie. Il rialzo delle transaminasi (AST 496, ALT 167 U/l), della bilirubina (2.7 mg/dl) e segni di epatopatia all'eco epatico avevano orientato il ricovero al reparto infettivi. Gli accertamenti strumentali eseguiti durante il ricovero confermavano un interessamento epatico e la presenza di ulcera duodenale. Veniva richiesta la determinazione dell'assetto emoglobinico che rilevava alla HPLC due picchi anomali eluenti in finestra S e C. I tests di conferma documentavano la presenza di doppia eterozigosi Hb S/C. Il paziente veniva dimesso con diagnosi di crisi falcemica.

Discussione: Il suggerimento del patologo clinico orientava il percorso diagnostico e consentiva la diagnosi di crisi falcemica, scatenata verosimilmente dal rapido sbalzo di temperatura ambientale. All'ingresso il rialzo delle transaminasi e della bilirubina associati ai dati dell'eco epatico avevano orientato verso una patologia epatica acuta. L'elevata intensità dolorosa, peraltro rilevata dal collega del PS, caratteristica delle crisi falcemiche, era l'unico elemento che poteva allertare verso una crisi falcemica. Il riscontro di emazie a bersaglio e a falce in presenza di anemia normocromica con segni di emolisi, in un paziente affetto da addominalgie tali da ricorrere al PS, avevano orientato il patologo clinico, la cui segnalazione ha contribuito a concludere l'iter diagnostico in una patologia ancora misconosciuta.

LINFOCITOSI B POLICLONALE PERSISTENTE. UNA RARA CONDIZIONE LINFOPROLIFERATIVA BENIGNA

A-17

F. Bottan, R. Pica, S. Fenu, F. Pauselli

U. O. D. Medician di Laboratorio, A. O. San Giovanni-Addolorata, Roma.

Scopo del lavoro. La linfocitosi B policlonale persistente (LBPP) è una rara sindrome linfoproliferativa descritta per la prima volta nel 1982. Sono state pubblicate poco più di un centinaio di segnalazioni. Riferiamo un caso da noi osservato.

Materiali e metodi. Una donna dell'età di 42 anni, forte fumatrice, si è rivolta al Servizio di Ematologia del nostro Ospedale per una linfocitosi assoluta (circa 6000 linfociti/ μ L) scoperta casualmente e persistente da due anni. Al momento della visita i linfociti erano 7291/ μ L. L'esame obiettivo e gli esami ematochimici non hanno evidenziato null'altro di rilevante. La tipizzazione citofluorimetrica standard delle sottopopolazioni linfocitarie ha rilevato una rimarchevole linfocitosi B assoluta (4030 linfociti CD19+/ μ L). È stato eseguito uno studio citofluorimetrico dell'immunofenotipo B linfocitario utilizzando un pannello diagnostico a 6 fluorescenze per malattie linfoproliferative B comprendente anticorpi specifici per i seguenti antigeni: CD45 CD19 CD5 CD10 CD11c CD20 CD22 CD23 CD25 CD31 CD38 CD43 CD79b CD103 FMC7 catene leggere KAPPA e LAMBDA. L'esame è stato eseguito su citofluorimetro BD FACSCantoII a 6 colori. I dati sono stati acquisiti ed analizzati con software DIVA.

Risultati. I linfociti B avevano il seguente immunofenotipo: CD45+ CD19+ CD20+ CD22+ CD79b+ CD11c±(40%)FMC7±(57%). L'espressione delle catene leggere di superficie era così ripartita: sIgKAPPA=60%, sIgLAMBDA=40%. Negativi tutti gli altri marcatori testati. In base a tali risultati è stata posta diagnosi di LBPP.

Discussione e conclusioni. La LBPP è definita come una condizione di persistente linfocitosi (>4000 linfociti/ μ L) dovuta ad espansione non clonale delle cellule B. A causa della estrema rarità non sono disponibili dati sulla sua incidenza e prevalenza. I soggetti interessati sono quasi esclusivamente donne fumatrici di età compresa fra i 40 e i 50 anni. Tratti immunofenotipici caratteristici sono l'assenza del CD5 e del CD23 e l'espressione modicamente aumentata rispetto alla norma di CD79b ed FMC7. Il caso da noi osservato è tipico per l'immunofenotipo B linfocitario, per l'età ed il sesso della paziente e per l'associazione con tabagismo. Non sono stati riscontrati altri sintomi associati a LBPP, quali ipergammaglobulinemia IgM e presenza in circolo di sporadici linfociti villosi o binucleati. Sono ancora da indagare l'eventuale presenza dell'aplotipo HLA-DR7 e dell'alterazione citogenetica +i(3q), riscontrati nella maggioranza dei casi di LBPP recentemente riportati in letteratura.

CARATTERISTICHE CELLULARI DEGLI EOSINOFILI IN FISIOLOGIA E IN PATOLOGIA

A-18

A.M. Cenci, M. Blasi, A. Coco, P. Ferrari, M. Varani, R. Rizkallah

Lab. Pat. Clinica-Corelab NOCSAE-AUSL Modena

Introduzione. Vari processi producono negli eosinofili mutazioni di numero e morfologia, quali aumento della concentrazione nel sangue periferico e degranolazione, anche importanti, e vere espressioni di displasia.

Scopo del lavoro. Valutare le caratteristiche degli eosinofili attraverso i Research Population Data (RPD) e la loro utilità nella revisione dei campioni con anomalie (reattività; displasia).

Materiali e Metodi. Coulter LH750, fornisce RPD (medie e DS delle caratteristiche cellulari) con tecnologia VCS (Volume, Conduttività, Scatter) descrivendo così grandezza/densità del nucleo, rapporto nucleo/citoplasma, granulazioni citoplasmatiche. Abbiamo analizzato gli RPD EO di 160 campioni (120 con EO#<0.5 e 40 >0.5) da pazienti afferenti al Laboratorio NOCSAE, osservati i grafici strumentali e la morfologia su striscio di sangue periferico (su panottica automatizzata tipo Wright) e dosato, negli stessi pazienti, le IgE totali (metodo CLIA, Beckman-Coulter).

Risultati. Si sono ricavati i valori di RPD EO nei campioni normali ed eosinofilici (di cui 12 con degranulazioni); nei normali, per i valori di riferimento delle medie, ad oggi assenti in letteratura, risulta caratteristica un'ampiezza di distribuzione stretta segno di popolazione omogenea (V: 161.5 (149.3 – 173.7); C: 45.5 (39.3 – 151.6); S: 198.5 (190.9 – 206.1). Normali ed eosinofilie, sostanzialmente simili, mostrano solo maggior variabilità di Scatter (S) negli eosinofilici (Varianza 15 normali vs 43.3 eosinofilie). RPD da normali e da eosinofilici su comprovata base allergica, mostrano corrispondenza senza anomalie particolari o specifiche anche ad alte concentrazioni di IgE. In un sottogruppo con degranolazione e/o displasia, verificati su morfologia e strumento, si riconoscono caratteristiche di S distinte dal normale e dagli altri campioni patologici. L'analisi della curva ROC dei valori di S medio EO permette di individuare un cut off di 193 con AUC di 0.97.

Considerazioni e conclusioni. Scatter medio EO risulta correlato con la morfologia ed efficace nel descrivere fenomeni di degranolazione. In rari casi, lo spostamento del cluster può determinare un overlap rispetto ai neutrofili, con errata interpretazione morfologica e possibili errori di conteggio. L'andamento dei RPD di questa casistica supporta la loro introduzione in routine quale utile strumento nello studio di reattività o di disgranularità legata a displasia. La valutazione dei casi di sovrapposizione con i neutrofili e l'utilizzo del rapporto tra S medio EO e NE sembra poter aiutare la distinzione tra presenza di displasia dalla semplice degranolazione reattiva. Una valutazione degli stadi immaturi, non rilevati nel campione studiato, si può verosimilmente apprezzare attraverso l'esame della dispersione dei volumi.

IL CONTRIBUTO ATTUALE DELLA MORFOLOGIA IN EMATOLOGIA TRA LUCI ED OMBRE: 4 CASI CLINICI

A-19

A.M. Cenci¹, D. Campioli²

¹Dip.Pat.Clin. Corelab NOCSAE-AUSL; ²Laboratorio Analisi Chim-Clin. Policlinico Modena

Introduzione Ancora molti sono i quesiti legati al valore della morfologia tradizionale in un'epoca di riconoscimenti cellulari tecnologici e complessi.

Scopo del lavoro. Segnalare esempi di casi clinici da routine per cui l'impressione morfologica al primo contatto con il laboratorio di ematologia (emocromo in automazione ed osservazione microscopica sangue periferico) è risultata definitiva, suggestiva per percorsi di conferma, discordante rispetto al risultato delle successive verifiche.

Materiali e metodi 4 campioni per emocromo in K2EDTA random ed ex novo dalla routine (esterni o PS), studiati con 1 o più dei 3 analizzatori a differente filosofia analitica nei Laboratori della Provincia; test di conferma (verifica materiale correlato, immunofenotipo, biologia molecolare) inviati centralmente al Servizio Ematologia del Policlinico di Modena.

Risultati: F, a.58: febbre, petecchie, profonda astenia. Leucopenia e piastrinopenia severa, discreta anemia; allarmi strumentali e morfologia cluster da popolazione monomorfa atipica, mieloide, immatura, complessa. Al microscopio, netta prevalenza di promielociti atipici. Ipotesi diagnostica: LAP; immediata conferma in biologia molecolare (PML/RARalfa+). F, a.37: in PS per dispnea ingravescente da sindrome mediastinica. Modiche leucocitosi, piastrinopenia e anemia; allarmi e morfologia cluster da popolazione monomorfa, atipica, immatura, complessa. Al microscopio elementi linfoidi con nucleo fortemente convoluto. Sospetta LAL a morfologia T. Conferma immunofenotipica. M, a.19, origine siciliana, al PS per febbre e dolore addominale. All'esame strumentale modesta anemia; al M.O. plt giganti target cells, ed una quota notevole di emazie a falce. Ipotesi di doppia eterozigosi C ed S; conferma clinica di splenomegalia ed episodi ripetuti della stessa natura; conferma di laboratorio mediante studio Hb. M, a.9: in PS per astenia febbre, linfonodi, leucocitosi, piastrinopenia, anemia; allarmi e morfologia cluster monomorfo, atipico, immaturo ed evidenza, al M.O. di elementi linfoidi con nucleo fortemente convoluto, da cui il sospetto di LAL con morfologia T non confermata all'indagine immunofenotipica si (LAL B, CALLA+).

Discussione e conclusioni: La morfologia riveste ancora una forte ruolo di suggerimento e supporto diagnostico in prima battuta (casi 1, 2 e 3). Tuttavia, a causa della forte aleatorietà interpretativa legata all'esperienza dell'operatore e agli innumerevoli gradi di libertà dell'espressione morfologica spontanea in biologia per individualità, eziopatogenesi, ambiente e fenotipo, occorrono seri percorsi oggettivi di conferma, e una grande disponibilità nell'osservare prima di interpretare e nel cambiare un'eventuale idea iniziale, pur convincente, se non supportata da conferme oggettive.

RETICOLOCITOPENIE E DETERMINAZIONE STRUMENTALE

A-20

B. Biasioli, M. Buttarello, P. Bulian, B. Casolari, P. Cappelletti, AM. Cenci, G. Da Rin, M. Diquattro, P. Doretto, C. Feruglio, I. Fusco, M. Golato, M. Maconi, V. Miconi, M. Moretti, F. Papa, L. Pasini, C. Piccinini, E. Piva, F. Siviero
Gruppo di Studio in Ematologia SIMeL (GdS-E)

Introduzione. Il conteggio dei reticolociti fornisce la stima quantitativa della cinetica dell'eritropoiesi e i parametri reticolocitari l'informazione immediata della sua qualità. Nel 2008 il GdS-E eseguiva una valutazione comparata dei 5 strumenti ematologici presenti sul mercato con l'obiettivo di focalizzare i punti delicati della sensibilità/specificità clinica e delle informazioni funzionali e prognostiche in diversi ambiti di patologia.

Scopo del lavoro. Confronto di performance nel conteggio reticolocitario in reticolocitopenia tra strumenti (Abbott Shappire, Beckman Coulter LH780, Horiba Abx Pentra DX, Siemens Advia 2120, Sysmex XE2100) e metodo di riferimento secondo protocollo CSLI-ICSH H44-A2. L'osservazione dei 4 valutatori dedicati alla lettura microscopica, si è avvalsa della standardizzazione dei campi di immagine valutati attraverso fotografia digitalizzata dei preparati.

Materiali e Metodi. 88 campioni di sangue periferico in EDTA analizzati entro 6 ore dal prelievo sui 5 sistemi in valutazione, sono stati selezionati per reticolocitopenia ($Ret\# \leq 0,5\%$ alla rilevazione di almeno 3 strumenti). Per ogni campione è stato allestito il preparato con Nuovo Blu di Metilene, fotografato al M.O. ad ingrandimento 100x. I conteggi microscopici sono stati effettuati da 4 osservatori esperti prequalificati con medesima metodologia su campi fotografati. L'analisi statistica è stata effettuata con software MedCalc.

Risultati. Nello studio, l'imprecisione nel conteggio RET# risulta variabile tra strumenti (CV% 14-36%). Il confronto con il metodo di riferimento mediante regressioni lineari evidenzia pendenze da 0,18 a 0,48, intercette da 0,35 a 0,48 e coefficiente di determinazione R² da 0,30 a 0,45. La valutazione della precisione con coefficiente di correlazione r (p Pearson) mostra valori da 0,55 a 0,67; mentre l'accuratezza valutata con Cb (bias correction factor) da 0,23 a 0,82.

Considerazioni e conclusioni. Dai dati preliminari vengono riconfermate anche per la tecnologia automatizzata le difficoltà dei conteggi reticolocitari a bassi valori in precisione ed accuratezza già osservate in occasione della precedente sperimentazione del GdS-E (2003). Le problematiche non sembrano ugualmente importanti per tutte le filosofie analitiche testate e, comunque, la performance strumentale risulta più soddisfacente rispetto ad metodo di riferimento ottico, tuttora in uso e ormai sempre più discusso. A complemento dello studio, risulta utile, la valutazione dei parametri reticolocitari che possono fornire informazioni cliniche complementari per una migliore valutazione diagnostica e prognostica nelle singole patologie.

EMOSTASI E PORPORA PIASTRINOPENICA IMMUNOLOGICA (ITP): LE MICROPARTICELLE PIASTRINICHE

A-21

M. Diquattro¹, P. Farruggia², F. Gagliano², A.M. Tagliavia¹, M. Marcatti¹, G. Giaccone³, S. Scola¹, B. Palma¹

¹Laboratorio di Patologia Clinica - A.R.N.A.S. Civico - Palermo; ²Ospedale G. Di Cristina, Palermo; ³Abbott Diagnostics Division, Roma

Introduzione: Il quadro clinico dell'ITP può essere asintomatico, per la presenza di grandi piastrine e di microparticelle piastriniche.

Scopo del lavoro: descrivere la presenza di microparticelle piastriniche in pazienti con ITP.

Materiali e Metodi: sono stati studiati 35 pazienti pediatrici con ITP. Analisi su sangue intero in EDTA_{K3} con CDSapphire Abbott, le microparticelle (PMP, %) in PLTflow mode (0°, 7° e 90°) e fluorescenza FL1-FL3, CD61-CD41, con gate Axial Light Loss < 25; l'elaborazione dei dati con MedCalc.

Risultati: tab. 1. PMP (%) e densità piastrinica (SSC): r -0,5936, (95% C.I. -0,7738 to -0,3245, p=0,0002), volume piastrinico medio (MPV, fL) e conta immunologica (CD61, x10³/μl): r -0,5936, (95% C.I. -0,7738 to -0,3245, p=0,0002), conta piastrinica e PMP: r 0,3440, (95% C.I. 0,01218 to 0,6076, p=0,0430).

N.35	Median	95% CI	Minimum	Maximum
CD61 (x10 ³ /μl)	31,000	14,682 - 44,935	0,317	127,000
MPV (fL)	12,100	11,188 - 13,870	5,570	17,800
PMP (%)	0,330	0,260 - 0,469	0,000	1,790
FSC	514,460	460,695 - 626,529	254,260	1155,000
SSC	319,140	286,905 - 352,795	164,970	559,000

Conclusioni: in presenza di severa piastrinopenia si evidenziano volumi piastrinici alti, la presenza di microparticelle piastriniche si associa alla presenza di piastrine a bassa densità ottica. Il ruolo delle microparticelle piastriniche nell'ITP ai fini prognostici è ancora da definire.

UN CASO DI LEUCEMIA ACUTA PROMIELOCITICA CON TRASLOCAZIONE (11;17)(q23;q21) ED ESPRESSIONE DI CD56

A-22

R. Morandini¹, E. Ascari¹, M. Calarco¹, A. Jager¹, A. Regazzoli¹, L. Orsini¹, C. Remiddi², E. Zola¹, B. Milanesi³, L. Caimi¹

¹Lab. Analisi e ²U.O. Ematologia A.O. Spedali Civili Brescia, ³Dip.Med. di Laboratorio A.O. Desenzano d/G

Scopo del lavoro: descrizione di un caso di leucemia acuta promielocitica con traslocazione rara.

Materiali e metodi: paziente di anni 45 ricoverato in ematologia per riscontro occasionale di anemia, piastrinopenia e leucocitosi; asintomatico, esame obiettivo negativo.

Risultati: all'ingresso l'emocromo evidenziava WBC: 18.060/microL, Hgb: 8.7 g/dl, PLT: 52.000/microL. Sia all'esame microscopico dello striscio di sangue periferico sia a quello dell'aspirato midollare si osservava la presenza di numerose cellule atipiche (90% circa) con citoplasma ipergranulato e raramente con corpi di Auer, morfologicamente correlabili ad una leucemia acuta promielocitica (APL), pur senza la tipica morfologia lobata e convoluta dei nuclei, che in questo caso si presentavano per lo più ovali o tondi. La reazione del Sudan nero risultava intensamente positiva in tutte le cellule leucemiche, mentre quella per l'alfa-naphtyl-acetato esterasi era negativa, con un quadro citochimico compatibile con APL. La tipizzazione immunofenotipica su sangue midollare evidenziava la presenza di un cluster di cellule blastiche in percentuale pari al 95% dei leucociti totali, con fenotipo: CD34-, CD117+, CD33+, CD13+, HLA-DR-, CD56+. Per la conferma diagnostica veniva ricercata con la PCR la traslocazione t(15;17)(q22;q12) che porta alla formazione del gene di fusione PML-RARA, osservata in più del 90% dei casi di APL, e contemporaneamente veniva inviata l'analisi del cariotipo. L'esito negativo della PCR per PML-RARA sembrava smentire l'ipotesi di APL, diagnosi che era invece successivamente confermata dall'analisi del cariotipo, che mostrava la presenza di metafasi con traslocazione t(11;17)(q23;q21), che genera il gene di fusione PLZF-RARA. Si decideva pertanto di procedere con ATRA e G-CSF. Dopo 6 giorni, per comparsa di sindrome da ATRA, si iniziava desametasone e si sospendeva ATRA, ripreso 4 giorni dopo al 50% della dose. Nei giorni successivi e alla dimissione il paziente era in buone condizioni generali e con parametri ematologici in progressivo miglioramento.

Discussione e conclusioni: il caso clinico presentato è interessante perché la dimostrazione della rara traslocazione t(11;17)(q23;q21) ha confermato l'ipotesi diagnostica di APL indicata inizialmente dal quadro morfologico, citochimico ed immunofenotipico; è anche da sottolineare la morfologia regolare e non convoluta dei nuclei e l'espressione dell'antigene CD56, che è stata descritta in letteratura nella maggior parte dei casi di APL con PLZF-RARA (nonostante possa essere presente in una piccola percentuale di casi con PML-RARA) e che quindi può far sospettare questa rara traslocazione.

DIAGNOSI ALLO STRISCIO PERIFERICO DI UN CASO DI MALARIA NEONATALE**A-23****A. Jager¹, E. Ascari¹, M. Calarco¹, M. Morandi¹, R. Morandini¹, V. Pasotti¹, A. Regazzoli¹, V. Spinoni², B. Milanesi³, L. Caimi¹**¹Lab. Analisi e ²U.O. Pat. Neonatale A.O. Spedali Civili Brescia, ³Dip. Med. di Laboratorio A.O. Desenzano d/G

Scopo del lavoro: si descrive un caso di malaria da *P. Vivax* in neonata Pakistana priva di precedenti anamnestici. Tra i parassiti malarici il *Vivax*, iniettato nel circolo sanguigno, raggiunge il fegato dove si moltiplica e può rimanere dormiente (ipnozoita) per settimane, mesi o addirittura anni prima di riattivarsi e indurre l'accesso malarico.

Materiali e metodi: la madre, con anamnesi apparentemente silente per malaria, da oltre un anno non si recava in zone endemiche; durante la gravidanza era stata ricoverata alla 32w per febbre e vomito accompagnati da piastrinopenia. Dopo parto spontaneo, la neonata al 22° giorno di vita era ricoverata in condizioni generali scadenti, con febbre, aspetto distrofico, cute pallida e mazzata ed epatosplenomegalia. I valori riscontrati all'emocromo mostravano Hgb 12.3g/dl, WBC 4.960/mmc, PLT 14.000/mmc, PCR 73.2 mg/L.

Risultati: l'esame microscopico dello striscio periferico con colorazione May-Grunwald-Giemsa evidenziava la presenza di numerosi trofozoiti e alcuni schizonti malarici. La diagnosi di malaria era poi confermata, nei giorni seguenti, con la ricerca su goccia spessa e con il test di amplificazione genica, entrambe positive per *Plasmodium Vivax*, mentre l'esame microscopico sul sangue della madre dava esito negativo. La terapia con cloroquina e primachina risolveva rapidamente il quadro e normalizzava l'emocromo e lo striscio periferico.

Discussione e Conclusioni: il caso clinico presentato è singolare perché solo grazie all'esecuzione dello striscio periferico si è potuto diagnosticare la malaria in una zona geografica non endemica e in assenza di alcun sospetto clinico per tale patologia. Solo in un secondo tempo la madre riferiva un viaggio in Pakistan l'anno precedente e, pur senza documentazione clinica, di aver contratto la malaria. Si può così ipotizzare che durante la gravidanza il *P. Vivax* sia rimasto latente come ipnozoita, forse con una piccola recidiva riconducibile all'episodio febbrile. La trasmissione materno-fetale dovrebbe quindi essere avvenuta durante il parto, visto l'iniziale stato di buona salute della neonata. Si segnala che, a tutt'oggi dopo oltre due mesi, non è stato possibile evidenziare la presenza del parassita nel sangue materno. L'osservazione microscopica dello striscio di sangue periferico, che nel nostro Laboratorio è eseguita routinariamente sui campioni dei pazienti della Patologia Neonatale, principalmente per la ricerca del numero di granulociti neutrofili immaturi come indice di sepsi, è risultata in questo caso fondamentale per l'identificazione di questa parassitosi, trasmessa per via materno-fetale, in completa assenza di sospetto clinico ed anamnestico.

SVILUPPO DI LEUCEMIA ACUTA PROMIELOCITICA IN PAZIENTE CON LEUCEMIA LINFATICA CRONICA**A-24****P. D'Altoè, P. Doretto, E. Mauro¹, A. Ermacora¹, L. Virgolini¹, A. Cuneo², P. Cappelletti**Patologia Clinica, DML e ¹Medicina II, AOSMA Pordenone, ²Ematologia Arcispedale S. Anna Ferrara

Scopo del lavoro. Sebbene ci sia un'alta incidenza di neoplasie secondarie in pazienti con leucemia linfatica cronica (LLC), sono stati descritti rari casi di sviluppo di leucemie mieloidi acute o sindromi mielodisplastiche (SMD) in tali pazienti, trattandosi per lo più di forme secondarie e con cariotipo sfavorevole. Riportiamo il caso di una paziente di 78 anni affetta da 5 anni da LLC stadio 0A (Rai/Binet) con citogenetica negativa, mai trattata e con ipogammaglobulinemia, vista per un controllo di routine.

Materiali e Metodi. L'esame emocromocitometrico mostrava la comparsa di anemia (Hb 11.9 g/dL), piastrinopenia (Plt 115000/μL) e neutropenia (N 1100/μL) con WBC 5810/μL. Allo striscio periferico: quadro monomorfo di piccoli linfociti e lieve neutropenia. Obiettività toraco-addominale nella norma, calo ponderale significativo e deficit mnesici e di concentrazione. Per tale motivo la paziente viene rivalutata con agoaspirato e biopsia ossea.

Risultati. All'agoaspirato midollare frustoli ipercellulati costituiti prevalentemente da promielociti atipici con corpi di Auer singoli o affastellati e/o granuli confluenti grossolani a tipo Chediak-Higashi ed in parte da un infiltrato talora pseudo nodulare di piccoli linfociti pachicromatici, compatibile con leucemia acuta promielocitica (APL) con residuo di LLC nota, dati confermati dalla biopsia ossea. All'immunofenotipo presenza di due distinte popolazioni patologiche, una di linfociti B clonali compatibili con LLC e di una con fenotipo promielocitico (CD45+ dim, CD33+ a banda stretta, CD13+ disomogeneo, HLA-DR-, CD34-, CD117+, CD15-, CD14-, CD2-, CD5-, CD11c debole). Negative l'analisi citogenetica standard e FISH con sonda specifica per la traslocazione t(15;17) eseguite su sangue periferico e midollare; positiva invece l'analisi molecolare su sangue periferico e midollare con metodica RT-PCR per il riarrangiamento PML-RARα con punto di rottura 3 sul gene PML (BCR3).

Discussione e Conclusioni. A nostra conoscenza, sono riportati un solo caso di APL insorto in paziente con LLC ma dopo radioterapia per una neoplasia prostatica e un caso di SMD secondaria a chemioterapia per LLC con der(17)t(12;17). La peculiarità e unicità del nostro caso risiede nello sviluppo di una APL in un paziente con LLC senza alterazioni cromosomiche e mai sottoposta a trattamento chemio o radioterapico. L'assenza di anomalie citogenetiche nella popolazione linfoide e la negatività della FISH non permette di escludere che le due popolazioni siano clonalmente correlate.

CASO CLINICO: INTERFERENZA DA ANTICORPI ETEROFILI NEL DOSAGGIO DEL DIMERO-D**A-25**

D. Giavarina, A. Fortunato, B. Faresin, A. Zanfrà, L. Bedin, G. Rossetti, U. Pizzolato, M.T. Comberlato, G. Soffiati
 Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

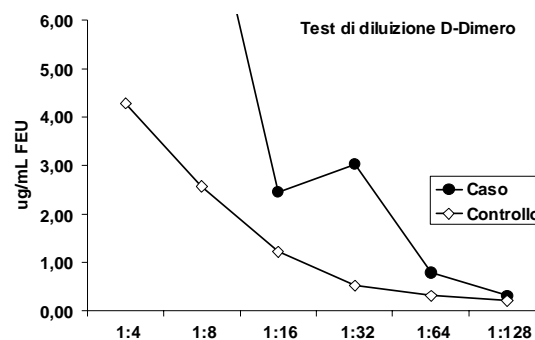
Viene presentato un caso di interferenza al dosaggio del D-Dimero, in una paziente segnalata al laboratorio per una possibile interferenza nel dosaggio della concentrazione di Troponina I.

Caso Clinico Donna di 50 anni, ricoverata presso la divisione di cardiologia per valvulopatia, viene segnalata, per una positività persistente a basse concentrazioni di Troponina I (dal 17 al 24/02/2009, concentrazioni quotidiane tra 0,39 e 0,43 ng/mL), con concentrazioni di mioglobina inferiori a 40 ng/mL. Un test di diluizione in data 24 dimostra la riduzione delle concentrazioni di Troponina al di sotto del cut-off per danno miocellulare (0,07 mg/mL) già alla diluizione 1:2. Il riscontro dell'interferenza da probabile presenza di anticorpi eterofili, porta l'attenzione alle concentrazioni di D-dimero, da giorni oltre 20 µg/mL FEU.

Studio dell'interferenza. Il D-Dimero è misurato con un dosaggio di agglutinazione al lattice su strumentazione automatica (STALiatest™, Diagnostica Stago, Roche, Basel, Switzerland). Sono stati eseguiti test diluizioni a raddoppio, fino al limite di sensibilità del metodo (0,22 µg/mL FEU). Un campione noto con concentrazione di D-Dimero di 18 µg/mL FEU è stato diluito allo stesso modo per controllo. La figura mostra le concentrazioni scalari del campione e del controllo. I recuperi, per le diluizioni 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128, espressi in µg/mL FEU, sono stati, rispettivamente per il controllo 21, 20, 18, 20 e sotto il limite di sensibilità; per il campione 74, 39, 97, 51, 41 µg/mL FEU.

Discussione. Il test di diluizione dimostra una forte interferenza, non costante e che non si riduce anche a forte diluizione. Si conferma la presenza di interferenti al dosaggio immunologico di agglutinazione. La presenza di anticorpi interferenti di tipo eterofilo, tipici dei dosaggi immunologici, è raramente considerata come fonte di possibile errore in coagulazione.

Si conferma la necessità di valutare, anche in ambito laboratoristico, il paziente nel suo insieme e non per singole specialità diagnostiche.

**DOSAGGIO DEI D-DIMERI E APPROPRIATEZZA DELLE RICHIESTE****A-26**

F. Ferrari, C. Bodini, C. Beati, L. Bassi, O. Paoletti, G. Spotti, A. Alatri, A. Zimmermann, S. Testa

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Centro Emostasi e Trombosi, AO Istituti Ospitalieri, Cremona

Scopo del lavoro: Il dosaggio dei D-Dimeri (DD) è indicato in 3 condizioni cliniche: l'esclusione del tromboembolismo venoso (TEV), la valutazione del rischio di recidiva tromboembolica e la diagnosi e monitoraggio delle coagulopatie da consumo nell'ambito di score validati. Scopo del lavoro è stato valutare l'andamento delle richieste di dosaggio dei DD nella nostra realtà ospedaliera, prima e dopo interventi formativi, e valutarne l'appropriatezza in relazione alle diagnosi positive.

Materiali e Metodi: È stato considerato il periodo compreso tra gli anni 2003 e 2008. L'estrazione automatica dei dati per i singoli reparti di degenza e il Pronto Soccorso è stata possibile attraverso il software Metafora-Concerto. I dati relativi agli eventi clinici sono stati ottenuti dal data base del centro Emostasi e Trombosi (TAOnet-Roche). Complessivamente sono stati valutati il numero annuo di ricoveri, le richieste di DD, le diagnosi positive per TEV, le recidive e i monitoraggi per coagulopatia. Specifici interventi formativi sono stati effettuati tra gli anni 2004 e 2005.

Risultati: L'analisi dei dati evidenzia un trend in aumento del numero di accessi al Pronto Soccorso e ai reparti di degenza, passando da un totale di 63.747 pazienti nel 2003 a 66.611 nel 2008. Per quanto riguarda il totale delle richieste dei DDimeri si è al contrario osservata una riduzione significativa da un totale di 2969 test nel 2003 a 2492 nel 2008 (-17%). Considerando il numero di diagnosi positive per TEV/anno si è evidenziato il progressivo aumento della percentuale di diagnosi positive rispetto al numero di test richiesti (da 6.5% nel 2003 a 10.7% nel 2008). Inoltre, considerando che il sospetto di TEV si verifica con una frequenza 10 volte superiore rispetto alla reale incidenza della malattia, si può dedurre che nel 2003 il grado di inappropriata fosse pari al 34% confrontato con il 2% circa del 2008 (1950 sospetti diagnostici/2969 test eseguiti nel 2003 vs 2440 sospetti diagnostici/2492 test eseguiti).

Conclusioni: Obiettivo del Laboratorio Ospedaliero moderno dovrebbe essere quello di raggiungere un elevato livello di appropriatezza. Così come in altri settori specialistici, dai nostri dati emergeva che anche le richieste relative al dosaggio dei DD non rientrassero nelle indicazioni per le quali il test ha ricevuto una validazione clinica. Gli interventi formativi rappresentano il mezzo più efficace per, non tanto ridurre il numero assoluto di esami inutili, ma e soprattutto per garantire al paziente il corretto utilizzo del dato analitico. Questa analisi ha evidenziato come in seguito all'applicazione di percorsi diagnostici condivisi l'appropriatezza della richiesta sia migliorata sensibilmente.

LA DIAGNOSTICA DECENTRATA NEL TERRITORIO DI PAZIENTI IN TAO, STRUTTURATA NEL SISTEMA DI GESTIONE DELLA QUALITÀ DEL LABORATORIO DELL'ULSS 17

A-27

A. Tinello, F. Manoni, V. Temporin, V. Cantarello, T. Zorzan, C. Vigato, M. Dalla Muta, L. Fornasiero, G. Casarotto, V. Sartori

Servizio di Medicina di Laboratorio Monselice-Este ULSS17 Regione Veneto

Scopo del lavoro: La Terapia Anticoagulante Orale (TAO) è una pratica medica che impegna notevoli risorse del SSN ed ha un notevole impatto sulla qualità di vita di pazienti. La maggior parte di tali pazienti è rappresentata da persone anziane, con evidenti problemi di autonomia, nasce così l'esigenza di poter decentrare nel territorio il monitoraggio. Recentemente la tecnologica ha portato all'avvento di nuovi coagulometri portatili, facilmente gestibili dai medici di base, evitando all'utenza lo spostamento verso le strutture ospedaliere. Lo scopo è stato quello di attuare una collaborazione tra figure diverse nell'ambito della stessa ULSS 17, al fine di creare una nuova modalità di gestione dei pazienti in TAO. Il processo ha coinvolto la Az. ULSS 17, i medici di base dei distretti di Monselice, Este e Conselve ed il servizio di Medicina di Laboratorio. Questo processo si inserisce all'interno del "Programma di valutazione esterna di qualità", che rappresenta uno strumento irrinunciabile per promuovere il miglioramento della qualità delle prestazioni di Laboratorio.

Materiali e metodi: Lo strumento utilizzato per il monitoraggio dei pazienti è "Coagucheck XS Plus" (Roche), un sistema per la determinazione quantitativa dei valori di coagulazione PT/INR che utilizza sangue capillare prelevato dal polpastrello o sangue venoso intero non anticoagulato. Esso indica sul display, tramite dei simboli, le diverse fasi operative fornendo, dopo l'applicazione del campione di sangue sulla striscia reattiva, il risultato del test in circa un minuto. L'inserimento di 39 strumenti di questo tipo pone la necessità di avere dei risultati analitici riproducibili e confrontabili tra loro. Allo scopo è stato effettuato un monitoraggio simultaneo dei vari strumenti presenti sul territorio, distribuendo come controllo un campione di sangue anticoagulato stabile per 24 ore a Ta, con valore noto di INR all'interno di un range terapeutico (1.6 – 4.5).

Risultati: I valori di INR rilevati da ciascun sistema si collocano all'interno di un range accettabile ($r=0.92$), rispetto al sistema di riferimento; l'imprecisione risulta essere pari a 5.9%.

Discussione e conclusioni: Dai risultati ottenuti è possibile affermare che l'utilizzo di coagulometri portatili sia in grado di soddisfare le esigenze di affidabilità e riproducibilità indispensabili nell'ambito di un monitoraggio clinico, offrendo vantaggi sul piano logistico-organizzativo e sulla compliance del paziente, il tutto senza pregiudicare la qualità di ogni singolo sistema strumento-operatore, opportunamente verificata dalla VEQ ad ogni singolo strumento dall'operatore competente.

FATTORE V LEIDEN A CHIOGGIA

A-28

E. Trabuio¹, S. Valverde¹, F. Antico¹, M. Salvadego³, P. Fassina³, M. Piva³, G. Gessoni^{1,3}

¹SML, ²Ematologia, ³SIT Chioggia

Scopo del Lavoro: Come riportato in precedenza abbiamo osservato in pazienti con trombosi venosa profonda (TVP) in Chioggia una prevalenza di fattore V Leiden (FVL) più elevata di quanto atteso. Abbiamo quindi ritenuto interessante valutare la prevalenza di tale polimorfismo in altri gruppi di soggetti.

Materiali e Metodi: Sono stati esaminati 796 soggetti così suddivisi: 292 pazienti con pregressa TVP (A), 234 donatori di sangue (B), 130 donne in età fertile (C) valutate per la prescrizione della terapia anti concezionale, 140 familiari consanguinei dei pazienti (D). In tutti questi soggetti il FVL è stato ricercato con test genetico.

Risultati: I risultati sono riportati nella tabella sottostante.

Tabella I: Prevalenza degli Omozigoti e degli Eterozigoti per FVL nella casistica considerata

Gruppo	N°	Omozigoti		Eterozigoti	
		N°	%	N°	%
Gruppo A	292	13	4,5	111	38,8
Gruppo B	234	1	0,4	26	11,1
Gruppo C	130	1	0,7	17	13,1
Gruppo D	140	2	1,4	30	21,4

Conclusioni: I risultati ottenuti confermano che in Chioggia il FVL presenta una elevatissima frequenza. Questo dato, riportato in un primo tempo in una casistica selezionata viene confermato dal presente studio. Infatti, sia tra i donatori abituali di sangue che tra le donne in età fertile valutate all'atto della prescrizione della terapia estro progestinica, abbiamo osservato una elevata prevalenza di portatori di FVL. Interessante ci sembra l'osservazione che, nel gruppo D, familiari consanguinei dei pazienti con TVP, la prevalenza dei portatori di FVL sia risultata intermedia tra quanto osservato negli altri gruppi.

DOSAGGIO DEL D-DIMERO: METODICHE A CONFRONTO**A-29****F. Accattato, L. Bompignano, G. Palmieri, R. Ienco, V. Celi**

Patologia clinica, Facoltà di Medicina, Università Magna Græcia, Catanzaro

Un aumento del livello del D-dimero, prodotto finale della proteolisi esercitata da parte del sistema fibrinolitico sulla fibrina stabilizzata, può essere osservato in numerose condizioni patologiche (tumori, CID, TEV, cardiopatia ischemica, infiammazione, patologie gravidiche). L'applicazione del dosaggio del D-dimero è attualmente ben consolidata nell'ambito delle strategie diagnostiche della TEV, grazie al suo alto valore predittivo negativo, mentre la sua utilità clinica in altre condizioni patologiche è tuttora dibattuta. Uno dei problemi principali dell'interpretazione di questo dosaggio è rappresentato dalla difficoltà di standardizzazione e ogni risultato è da considerarsi del tutto "metodo-specifico".

Scopo del lavoro: Nel presente lavoro sono stati messi a confronto per il dosaggio del D-dimero due metodi di agglutinazione quantitativi ed uno in ELISA. Tutti i metodi sono basati sull'impiego di anticorpi monoclonali che riconoscono epitopi specifici nella molecola.

Materiali e metodi: Il dosaggio del D-dimero è stato effettuato contemporaneamente su 240 pazienti, ricoverati presso il Policlinico Mater Domini nel mese di Luglio 2009. Lo stesso campione di ciascun paziente è stato analizzato con i sistemi D-Dimer Plus (BCS Dade-Behring), Sta Liatest D-Di (Diagnostica Stago) e Vidas D-Dimer Exclusion (Biomerieux). I primi due metodi sono basati sulla misura turbidimetrica del complesso antigene-anticorpo. I risultati sono disponibili in 5-10 min. e, trattandosi di sistemi completamente automatici, è ridotta la variabilità analitica. Il terzo metodo utilizzato è un test ELISA semi-automatizzato.

Risultati: La correlazione fra i risultati analitici ottenuti sullo stesso campione biologico è statisticamente significativa nel confronto tra le metodologie Sta Liatest e Vidas ($r=0,92$; $n=240$); mentre ha dato valori poco significativi nel confronto tra D-Dimer Plus vs Vidas ($r=0,70$; $n=240$); D-Dimer Plus vs Sta Liatest ($r=0,78$; $n=240$).

Discussione e Conclusioni: Il metodo in ELISA ha un'elevata sensibilità e dimostra un valore predittivo negativo tale da far preferire il suo impiego nel dosaggio del D-dimero, nell'ambito delle differenti strategie diagnostiche, per escludere la TEV. I limiti di questo metodo sono legati al fatto che non si adatta ad essere impiegato in situazioni di emergenza/urgenza, in quanto non è conveniente il suo utilizzo per campioni singoli ed i tempi di esecuzione sono più lunghi rispetto ai metodi immunoturbidimetrici (35-40 min). I risultati ottenuti dalla comparazione delle metodiche analizzate suggeriscono la possibilità di sostituire efficacemente il metodo ELISA semi-automatico Vidas D-Dimer Exclusion con il sistema immunoturbidimetrico Sta Liatest D-Di, laddove sia richiesta una risposta in tempi rapidi, come in emergenza/urgenza.

EFFICACIA CLINICA DELLA 'BIOPSIA SIEROLOGICA' NELLA DIAGNOSI DI GASTRITE AUTOIMMUNE**B-01****A. Antico, R. Tozzoli, R. Villalta, E. Tonutti, N. Bizzaro**

Gruppo di Studio Autoimmunità e Allergologia - SIMeL

Scopo: Valutare valore predittivo e efficacia clinica del dosaggio di alcuni parametri immunologici e ormonali nella selezione di pazienti da sottoporre a esofagogastroduodenoscopia (EGDS) per la diagnosi di gastrite autoimmune (GAI).

Materiali e metodi: Abbiamo reclutato 181 pazienti consecutivi (19 maschi/162 femmine; età 25-81 anni) con anemia ferropriva resistente alla terapia per os (39.8%) o dipendente da carenza di vitamina B12 (60.2%), condizioni cliniche correlate a GAI. In questi soggetti abbiamo dosato i marcatori predittivi di danno della mucosa gastrica: anticorpi anti-cellule parietali gastriche (APCA) con metodo immunoenzimatico (ELISA) quantitativo (Aesku.Diagnostics, cut-off: 30 U/mL); anticorpi anti-fattore intrinseco (anti-FI) con ELISA quantitativo (Aesku.Diagnostics, cut-off: 20 U/mL); gastrina con metodo immunochemiluminescente (ICMA) (Siemens, range: 13-115 pg/mL); anticorpi anti-Helicobacter pylori (Hp) con metodo ELISA (Orgentec, cut-off: 6 U/mL).

Risultati: 83 pazienti (45.8%) sono risultati positivi per APCA, 14 dei quali (16.8%) anche per anti-FI. La gastrinemia era significativamente aumentata in 44 (53%) soggetti APCA-positivi e in nessuno dei soggetti APCA-negativi. Gli anticorpi anti-Hp erano presenti in 33 (39.7%) pazienti. Gli 83 pazienti APCA positivi e 11 sieronegativi con sintomi di gastropatia, sono stati sottoposti a EGDS con biopsie gastriche multiple. Sulla base della diagnosi istologica è stato possibile stratificare i pazienti in 4 gruppi: 1) 30 (36%) pazienti (età: 53 ± 20) con quadro istologico di GAI mostravano APCA 65 ± 29 U/mL, gastrinemia 1048 ± 956 pg/mL, anti-FI assenti, anti-Hp presenti nel 26% dei casi; 2) 14 (17%) soggetti (età 70 ± 16) con atrofia gastrica metaplasica avevano APCA 59 ± 23 U/mL, positività per anti-FI, gastrinemia 1523 ± 713 pg/mL, anti-Hp assenti; 3) 18 (22%) pazienti (età 46 ± 12) con flogosi linfocitaria aspecifica mostravano APCA 52 ± 17 U/mL, gastrinemia nella norma, anti-FI assenti, anti-Hp presenti nel 21.1% dei pazienti; 4) 21 pazienti (età 71 ± 12) con APCA borderline, anti-FI e gastrinemia nella norma, tutti anti-Hp positivi erano affetti da gastrite atrofica multifocale. Gli 11 soggetti sieronegativi presentavano gastrite superficiale.

Conclusioni: Il dosaggio di quattro marcatori (APCA, anti-FI, gastrina, anti-Hp) si è dimostrato particolarmente efficace nell'inquadramento diagnostico delle gastriti e può essere considerato un profilo diagnostico di laboratorio (biopsia sierologica) indicato in soggetti che presentano anemia sideropenica resistente alla terapia orale o dipendente da carenza di vitamina B12. La positività per APCA e l'ipergastrinemia hanno elevato valore predittivo di GAI, mentre la presenza di anti-FI correla con un danno istologico più severo (atrofia metaplasica).

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNE CELLULO-MEDIATA VERSO UN PEPTIDE DEL RECETTORE MUSCARINICO 3 DELL'ACETILCOLINA IN PAZIENTI CON SINDROME DI SJÖGREN

B-02

G. Lobreglio, S. Scolozzi, M. Morciano, M. Fracasso, R. Cardinali, A. Mancarella, M. Belfiore

U.O. Medicina di Laboratorio, A.O. "Card G Panico", Tricase

Scopo del lavoro. La sindrome di Sjögren è una malattia autoimmune caratterizzata dal coinvolgimento anatomico e funzionale delle ghiandole esocrine. Di recente, nei pazienti affetti da questa malattia sono stati descritti autoanticorpi contro il recettore muscarinico 3 dell'acetilcolina (R3M) che potrebbero contribuire all'insorgenza delle manifestazioni orali ed oculari tipiche della malattia. Lo scopo di questo lavoro è di ricercare nel sangue periferico di pazienti con sindrome di Sjögren la presenza di linfociti T autoreattivi contro un peptide del recettore muscarinico 3 dell'acetilcolina, capaci di fornire l'help ai linfociti B per la produzione di autoanticorpi patogeneticamente rilevanti.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 16 pazienti affetti da sindrome di Sjögren primaria (14 femmine e 2 maschi; età media 48 ± 11 anni) e 10 soggetti normali di controllo paragonabili per sesso ed età. Le cellule mononucleate sono state separate mediante gradiente di densità da sangue periferico eparinato, portate alla concentrazione di 1×10^6 per ml, e stimolate con il peptide KRTVPPGECFIQLSEPTITFGTAI, corrispondente agli aminoacidi 213-237 del secondo dominio extracellulare di R3M, alla concentrazione di 10 µg/ml, con fitoemoagglutinina come controllo positivo e con tampone fosfato come controllo negativo. Dopo incubazione in termostato al 5% di CO₂, a 37 °C per 72 ore, l'attivazione dei linfociti T è stata valutata in citofluorimetria a flusso (Cytomics FC 500, Beckman Coulter) previa marcatura con gli anticorpi monoclonali anti-CD3 per identificare i linfociti T, anti-CD69 come marcatore precoce di attivazione, anti-CD25 (catena alfa del recettore di interleuchina 2) ed anti-HLA-DR (antigeni di istocompatibilità di II classe), entrambi espressi in seguito ad attivazione sui linfociti T.

Risultati. In 15 dei 16 pazienti affetti da sindrome di Sjögren i linfociti T stimolati con il peptide R3M esprimevano marcatori di attivazione in quantità statisticamente più elevata rispetto ai soggetti normali di controllo: $14,5\% \pm 5,1\%$ vs $1,6\% \pm 0,8\%$; $p < 0,001$.

Discussione e conclusioni. Questi risultati indicano che nel sangue periferico di pazienti affetti da sindrome di Sjögren ricircolano linfociti T autoreattivi verso un epitopo del recettore muscarinico 3 dell'acetilcolina, che oltre a fornire l'help ai linfociti B per la produzione di autoanticorpi di isotipo IgG ad alta affinità contro questo antigene, potrebbero svolgere un ruolo patogenetico diretto sugli epiteli delle ghiandole salivari e lacrimali che esprimono il recettore e contribuire, pertanto, all'insorgenza della xerofthalmia e xerostomia nei pazienti con sindrome di Sjögren.

ANTICORPIANTI-M2, M4 E M9 RILEVATI CON METODO DI LINE-IMMUNOASSAY IN SOGGETTI CON CIRROSI BILIARE PRIMITIVA AMA-NEGATIVA

B-03

N. Bizzaro, F. Cucchiario, F. Pesente

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Gemona del Friuli (UD)

Obiettivo: Gli anticorpi anti-mitocondri (AMA) sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi, con elevata specificità diagnostica e prognostica per la cirrosi biliare primitiva (PBC). In un vasto numero di pazienti con PBC, risultati negativi alla ricerca degli AMA con il metodo di immunofluorescenza (IFI) su triplice tessuto, abbiamo ricercato la presenza di anticorpi anti-antigeni mitocondriali M2, M4 e M9 con un metodo di immunoblotting, per verificare se la negatività registrata in IFI fosse reale o dovuta a scarsa sensibilità analitica del metodo IFI.

Metodi: Il siero di 98 pazienti AMA-negativi in IFI, raccolti dal Gruppo di Studio in Autoimmunologia della SIMeL, è stato analizzato con un metodo di line-immunoassay (LIA, Euroimmun, Padova) per la ricerca di anticorpi rivolti verso i tre principali antigeni mitocondriali M2, M4 e M9. Tutti i sieri sono stati analizzati anche con il metodo IFI su cellule HEp-2 (Inova, S.Diego, CA).

Risultati: 17 (17.3%) dei 98 pazienti AMA-negativi sono risultati positivi per M2 (2 di questi 17 anche per M4 e nessuno per M9). Su cellule HEp-2, 9 sieri hanno evidenziato una fluorescenza granulare citoplasmatica di tipo mitocondriale con un titolo $\geq 1:40$. Di questi 9, 5 sono risultati M2 positivi e 4 M2 negativi.

Conclusioni: L'aspetto più rilevante di questo studio, particolarmente significativo perché condotto sul più vasto gruppo di soggetti con PBC AMA negativi descritto a livello internazionale, è la discrepanza di risultati ottenuti con metodi analitici diversi nella determinazione degli AMA. I risultati dimostrano infatti che alcuni sieri che sono AMA-negativi su tessuto murino, sono invece positivi per M2 quando testati con il metodo LIA. Questi dati mettono in discussione l'utilizzo del metodo IFI come unico metodo per lo screening degli AMA, attualmente adottato nella maggior parte dei Laboratori clinici. Per una diagnosi accurata di PBC è perciò opportuno che in presenza di un consistente sospetto clinico, anche se la ricerca degli AMA in IFI è risultata negativa, venga utilizzato anche un altro metodo specifico per M2 prima di refertare come negativi i sieri, e ciò a maggior ragione quando vi sia il contestuale riscontro di un pattern citoplasmatico di tipo mitocondriale su cellule HEp-2. Questo studio conferma inoltre l'inutilità della ricerca delle specificità AMA M4 e M9 per la loro bassa frequenza e perché, quando presenti, sono sempre associate a positività per M2.

ANTICORPI ANTI TOPOISOMERASI I: VALUTAZIONE QUANTITATIVA**B-04****M. Lotzniker, G. Re, S. Finazzi, M. Curcillo, P. Faggioli¹**Laboratorio Analisi e ¹Medicina Interna A.O. Ospedale Civile di Legnano

Scopo del lavoro: La positività degli anticorpi anti topoisomerasi I (anti-topo I) in pazienti sclerodermici è stata correlata, in multiple segnalazioni della letteratura, sia all'evoluzione fibrotica che ad attività e gravità della malattia. Al contrario sono più limitati gli studi che focalizzano l'attenzione sulla "quantità" di anticorpo presente. Il nostro studio ha lo scopo di valutare, mediante multiple osservazioni e in un arco temporale di anni, l'andamento di anti-topo I nei pazienti sclerodermici afferenti al nostro laboratorio.

Materiali e Metodi: Casistica: 30 pazienti (età media 58 anni, range 23-80, F= 35 e M = 5, dcSSc = 16, lcSSc =14, numero medio di osservazioni = 9 (3-16), arco temporale di osservazione da 2 a 6 anni) valutati mediante classificazione EUSTAR e MEDSGER. Metodi: anti-topo I sono stati dosati mediante tecnica ELIA (Phadia) ed anche mediante line immunoassay (INNO-LIAANA, Innogenetics) per concentrazioni a ridosso del cut-off consigliato.

Risultati: Per ogni paziente è stata calcolata la mediana dei valori osservati e la casistica è stata suddivisa in 3 gruppi (valutazione in terzili): gruppo 1 (range 164-374), gruppo 2 (range 61-124), gruppo 3 (range 4-52). Tranne che in 2/30 casi in tutti i pazienti le variazioni quantitative di anti-topo I si sono mantenute, pur con ampie oscillazioni, nell'ambito del gruppo iniziale di appartenenza. Il gruppo 3 rispetto al gruppo 1 fa rilevare EUSTAR score migliorativo e, analogamente, la valutazione MEDSGER evidenzia nel gruppo 3 assenza di compromissione renale, muscolare e una minor compromissione articolare e gastrointestinale. Il gruppo 2 presenta caratteristiche cliniche sovrapponibili al gruppo 1. Per descrivere meglio l'andamento dei valori nei singoli pazienti è stato scelto come cut-off descrittivo arbitrario una variazione > del 50% tra osservazione iniziale e finale. 6 pazienti hanno evidenziato una variazione, 4 in aumento (+ 74, 92, 155 e 326%) e 2 in diminuzione (- 68, 69%) con evidente correlazione clinica solo in 1 caso (+326%).

Discussione e Conclusioni: Il valore quantitativo riscontrato alla prima osservazione sembra essere informativo su attività/gravità della malattia: concentrazioni di anti topo I nell'ambito del primo terzile contraddistinguono i pazienti con evoluzione clinica più favorevole. Variazioni anche consistenti e in trend costante di anti-topo I, peraltro riscontrate solo nel 20% dei pazienti, non sembrano essere di significativo ausilio in corso di monitoraggio. In attesa di una standardizzazione del dosaggio di anti-topo I (e quindi con il limite della metodo-dipendenza) l'espressione quantitativa routinaria di anti-topo I potrebbe fornire in fase diagnostica informazioni clinicamente utili.

UTILIZZO DELLA GLIADINA DEAMINATA NELLA DIAGNOSI DI CELIACHIA**B-05****G. Orso Giaccone¹, D. Zanella², C. Crocillà²**¹S.C.Laboratori Analisi Rivoli-Venaria ASLTO3 Rivoli (TO)²S.C. Laboratori Analisi Susa-Giaveno-Avigliana ASLTO3 Giaveno (TO)

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'utilità degli anticorpi antigliadina deaminata (DGP) in un gruppo di soggetti con anticorpi antitransglutaminasi negativi, parziale deficit di IgA sieriche totali ed EMA negativi nella diagnosi di celiachia.

Metodi. Sono stati testati 150 soggetti suddivisi in 3 fasce di età: un primo gruppo di età < ai 5 anni; un secondo gruppo di età compresa fra i 5 e 16 anni; un terzo gruppo di età superiore a 16 anni. I soggetti reclutati erano pazienti ai quali erano stati richiesti accertamenti sierologici per celiachia. Tutti i soggetti presentavano anti TtGA negativi; deficit parziale di IgA sieriche totali. Le IgA totali sono state dosate con kits Olympus su Oly 640. I valori di riferimento sono: 40 – 400 mg/dL. Per deficit di IgA si intendono valori < a 5 mg/dL, ma nel nostro lavoro abbiamo inserito anche soggetti che presentavano valori < a 35 mg/dL; i valori fra 3 e 5 mg/dL sono stati scelti per evitare che sfuggissero all'osservazione soggetti con deficit parziale di IgA ed EMA negativi. A questi soggetti sono stati eseguiti anche DGP IgA ed DGP IgG. Per le determinazioni sono stati usati Kits e strumento Zenit Plus della Ditta Menarini.

Risultati. I risultati ottenuti sono stati i seguenti: dei soggetti inclusi nella fascia di età <5 anni, 4 presentavano valori di AGA IgA > 150 U/mL e 3 presentavano valori di DGP IgG > 25 e > 80 U/mL; i soggetti inclusi nella fascia di età fra 5 e 16 anni 6 presentavano valori di AGA IgA > 150; i soggetti appartenenti alla fascia di età > 16 anni 6 hanno rilevato valori di DGP IgA compresi fra 55 e 190 U/mL.

Conclusioni. Ad una attenta analisi tutti i soggetti con valori di DGP IgA ed IgG alterati presentavano disturbi gastrointestinali; 6 presentavano pallore e 3 scarso accrescimento. Soltanto 1 soggetto ha evidenziato problemi di intolleranza ai latticini e nei primi mesi di vita ha sofferto di "dermatite atopica". E' pertanto utile seguire i pazienti DGP positivi nel tempo, sottoponendoli ad ulteriori test sierologici per valutare l'insorgenza di malattia celiaca. Risulta altresì interessante e di indubbia importanza l'utilizzo degli DGP nella diagnosi di celiachia nelle situazioni di screening nei casi particolarmente controversi prima di ricorrere all'esecuzione della biopsia.

VALUTAZIONE CLINICA DEL NUOVO TEST AESKULISA-PR3sensitiv PER LA DIAGNOSI DI GRANULOMATOSI DI WEGENER (GW)

B-06

L. Bianchi¹, R.A. Sinico¹, A. Palumbo², C. Farina³, A. Radice³

¹UOS Immunologia Clinica, ²UOC Microbiologia – A.O. Osp. S. Carlo Borromeo, Milano; ³Procrea SA, Lugano, Svizzera

Scopo del lavoro: Valutare la sensibilità diagnostica di un nuovo metodo ELISA per la determinazione di anticorpi anti-citoplasma dei granulociti neutrofili diretti verso la proteinasi 3 (ANCA-PR3), in confronto con i metodi disponibili. ANCA specifici per la PR3 e la MPO sono un importante marker diagnostico per le vasculiti primitive sistemiche (GW, MPA, SCS). La corretta determinazione degli ANCA prevede l'esecuzione combinata di IFI e la successiva identificazione del bersaglio antigenico mediante test Ag-specifici per PR3 e MPO. In IFI sono riconoscibili due quadri fluoroscopici principali: C-ANCA e P-ANCA. La PR3 è la specificità antigenica prevalente dei C-ANCA nelle vasculiti e C-ANCA/PR3-ANCA sono strettamente associati alla presenza di GW. La performance diagnostica dei sistemi PR3-ELISA disponibili è estremamente variabile e spesso non soddisfacente, in particolare per la ridotta sensibilità causata da alterazioni conformazionali/alterazioni della PR3 durante le fasi di purificazione e/o di coating. Un format proposto recentemente (PR3captureELISA) che utilizza in fase solida un MoAb di topo anti-PR3 allo scopo di "catturare" l'Ag e consentirne la migliore esposizione, sembra possedere una sensibilità diagnostica maggiore rispetto al test diretto.

Materiali e metodi: AeskulisaPR3sensitiv (AESKU Diagn. Germany distr. Grifols Italia), PR3captureELISA (commerciale), PR3directELISA e IFI (homemade). Il nuovo format AeskulisaPR3sensitiv utilizza piccole molecole spaziatriche per legare la PR3 umana purificata alla fase solida, consentendo l'esposizione di tutti gli epitopi antigenici e la loro accessibilità agli ANCA eventualmente presenti nel siero, escludendo nel contempo la possibile competizione tra il MoAb anti-PR3 e i PR3-ANCA per il legame all'Ag, potenzialmente presente nel PR3capture. Sono stati studiati 55 pz affetti da GW (8/55 IFI neg, 7/55 P-ANCA/MPO-ANCA) selezionati sulla base della diagnosi, indipendentemente dalla fase di attività, estensione della malattia e status ANCA. Per una valutazione realistica della specificità del test è stata indagata una appropriata popolazione di controllo, costituita da 94 pz con patologie in diagnosi differenziale o potenzialmente interferenti nei test ELISA, e 36 normali.

Risultati: Utilizzando il cut-off derivato dalle curve ROC (spec= 95%) la sensibilità complessiva di AeskulisaPR3sensitiv era del 71%, come atteso superiore a quella del PR3directELISA. La sensibilità del test aumentava considerevolmente quando valutata sulle sottopopolazioni ANCA-IFI+ve (76.6%) e C-ANCA-IFI+ve (89.7%). Inoltre il confronto delle curve ROC di AeskulisaPR3sensitiv e PR3captureELISA mostrava una performance sovrapponibile (AUC 0.939 vs 0.941).

Discussione e conclusioni: Sulla base di questi dati il test AeskulisaPR3sensitiv mostra una buona performance diagnostica, non solo nei pz con GW attiva, sistemica e non trattata, ma anche in situazioni cliniche meno eclatanti, laddove altri sistemi hanno mostrato dei limiti.

POSSIBILE RUOLO DELL'ANTIGENE LeY (CD174) NELLA RELAZIONE TRA HELICOBACTER PYLORI E PORPORA TROMBOCITOPENICA IDIOPATICA

B-07

B. Milanese¹, G. Bertalot², D. Coltrini³, C. Poiesi⁴, P. Perini¹, M. Favret², D. Veneri⁵, R. Negrini⁴

¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. Desenzano d/G; ²Servizio d' Anatomia Patologica del P.O. Manerbio/Leno A.O. Desenzano d/G; ³Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università di Brescia; ⁴Istituto di Microbiologia e di Virologia, Spedali Civili-Università di Brescia; ⁵Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Verona

Scopo del lavoro: negli ultimi anni numerosi studi sono stati pubblicati sulla relazione tra Helicobacter Pylori (HP) e porpora trombocitopenica idiopatica (ITP); è stato anche suggerito che la causa scatenante la ITP, dopo infezione da HP, sia legata ad un meccanismo di cross-reattività tra antigeni piastrinici e di HP. Scopo dello studio è di verificare se anticorpi monoclonali (mabs) anti-HP, che cross-reagiscono con antigeni di gruppo sanguigno, possano immunoreagire con piastrine e megacariociti normali e neoplastici, permettendo di identificare antigeni comuni che potrebbero essere indagati come possibile causa iniziale di un processo autoimmune.

Materiali e Metodi: abbiamo testato undici mabs anti-HP che cross-reagiscono contro antigeni di gruppo sanguigno (mabs anti-LeY: 1E52, HP151, R124, R35, A540, R63; mabs anti-LeX: A1, R39, 6H3; mab anti-H1: 4D2; mab anti-LeB: A105) con sezioni fissate in formalina ed incluse in paraffina ottenute da quindici biopsie osteomidollari (BOM) di pazienti in stadiazione per neoplasie epiteliali maligne, con due linee cellulari MEG-01 (leucemia M7) e KG1a (leucemia mieloide acuta, come controllo positivo) e con concentrati piastrinici previa fissazione ed inclusione in paraffina. Cinque BOM sono state pretrattate con α -L-fucosidasi (enzima glicolitico), per confermare la natura glicoproteica dell'antigene (LeY) riconosciuto dal mab 1E52, e poi testate come da routine.

Risultati: degli undici mabs testati sulle quindici BOM solo due (1E52 e HP151) hanno mostrato reattività citoplasmatica paranucleare nei megacariociti, nelle piastrine e focalmente nei blasti eritroidi. Questi due mabs riconoscono lo stesso epitopo dell'antigene LeY, ma 1E52 è una IgM e HP151 è una IgG. La linea cellulare MEG-01 è risultata marcatamente positiva al mab 1E52 a livello citoplasmatico e di membrana plasmatica. Il pretrattamento delle sezioni di cinque casi di BOM con l'enzima α -L-fucosidasi ha completamente abolito l'immunoreattività del mab 1E52.

Conclusioni: i dati ottenuti indicano che due mabs anti-HP riconoscono un epitopo dell'antigene LeY presente sia nell'HP sia nelle piastrine sia nei megacariociti normali e neoplastici. Questo risultato, mai segnalato in precedenza, è di notevole importanza, perché permette di ipotizzare come un meccanismo di cross-reattività possa essere alla base della relazione tra infezione da HP e ITP.

PARTICOLARE PATTERN IMMUNOFUOROSCOPICO EVIDENZIABILE IN RELAZIONE AL SUBSTRATO CELLULARE UTILIZZATO

B-08

M. Daves, I. Pusceddu, E. Peer, G. Cosio, F. Targa, C. Berenzi, D. Tumiatti, M. Bonometti, N. Lovat, F. Rizza, A. Mega¹

Laboratorio di Biochimica Clinica, ¹Divisione di Gastroenterologia, Ospedale di Bolzano, Azienda Sanitaria dell' Alto Adige

Scopo del lavoro: la valutazione degli anticorpi anti nucleo (ANA) ha acquisito notevole importanza nella diagnostica delle malattie autoimmuni. Attualmente la metodica di elezione per la ricerca degli ANA è l'immunofluorescenza indiretta (IFI) su monostrato di cellule derivanti da carcinoma laringeo umano (Hep-2). Sono inoltre presenti in commercio vetrini allestiti con cellule transgeniche sovraesprimenti l'antigene SSA 60kDa (Hep-2000). Riportiamo il caso di due pazienti seguiti dall'ambulatorio epatologico del nostro ospedale, che all'IFI per la ricerca di ANA eseguita con kit Nova Lite Hep-2 (Inova Diagnostics, San Diego, CA), in uso nel nostro laboratorio, presentavano un pattern citoplasmatico particolare, con strutture filamentose ed ad anello, riportato da alcuni autori come "Rings and Rods". Abbiamo voluto quindi testare i sieri su substrati cellulari di due differenti ditte per vedere eventuali differenze nel pattern fluoroscopico.

Materiali e Metodi: i sieri analizzati appartengono a due pazienti (età 65 e 64 anni) entrambi con diagnosi di epatite cronica HCV correlata, genotipo 1b, con fibrosi epatica marcata. I due pazienti risultavano essere stati trattati nei mesi precedenti con terapia interferonica, ma ambedue non responders. Successivamente venivano trattati con l'associazione peg-interferone e ribavirana, e durante tale terapia è stata richiesta la ricerca degli ANA.

Risultati: la determinazione ha evidenziato la presenza di un pattern nucleare di tipo omogeneo per il primo paziente e speckled per il secondo, entrambi a titolo 1/80. Ambedue presentavano inoltre un pattern citoplasmatico con strutture filamentose ed ad anello ben visibili a titolo 1/320. I sieri sono stati testati quindi con monostrati cellulari di due differenti ditte: ANA test Hep-2 (Zenit reagents A. Menarini Diagnostics, Firenze) e Hep-2000 Fluorescent ANA-Ro (ImmunoConcepts, Sacramento, CA). In IFI si evidenziava un pattern nucleare sovrapponibile a quello osservato con il kit Nova Lite Hep-2, ma inaspettatamente non si osservava il pattern citoplasmatico. Nei mesi successivi entrambi i pazienti sono risultati non responders alla terapia instaurata.

Discussione e Conclusioni: interessante il differente comportamento dei diversi kit utilizzati. Anche se la numerosità esigua dei campioni osservati non permette conclusioni, in via preliminare si può supporre che il pattern citoplasmatico osservato solo con un tipo di substrato possa dipendere dalle differenti fasi di allestimento dei vetrini a livello industriale (differenti procedure di preparazione e fissazione delle cellule).

IL DOSAGGIO DEGLI AUTOANTICORPI RIVOLTI CONTRO IL COMPLESSO TRANSGLUTAMINASI-PEPTIDI DI GLIADINA: UN NUOVO TEST PER LO SCREENING E LA DIAGNOSI DELLA MALATTIA CELIACA

B-09

R. Tozzoli^{1,2}, G. Kodermaz², L. Porcelli¹, B. Terzuoli¹, E. Tonutti¹, M. Tampoia¹, N. Bizzaro¹

¹Gruppo di Studio Autoimmunologia e Allergologia SIMeL

²Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ospedale di Latisana (Ud)

Scopo dello studio. In uno studio multicentrico, abbiamo valutato le caratteristiche analitiche e diagnostiche di un nuovo metodo immunoenzimatico per il dosaggio degli anticorpi anti-complesso transglutaminasi-peptidi di gliadina (CTPD), che utilizza come fase solida il complesso macromolecolare considerato, secondo recenti ipotesi, il fisiologico autoantigene della celiachia, e abbiamo operato il confronto con altri test anticorpali consolidati (anti-endomisio (EMA-IgA), anti-transglutaminasi (tTG-IgA), anti-peptidi deamidati di gliadina (DGP-IgA), condotti con l'impiego di metodi commerciali.

Metodi. Sono stati studiati 895 pazienti, di cui 81 affetti da celiachia non trattata (gruppo A), 486 affetti da malattie autoimmuni diverse dalla celiachia (gruppo B: lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide, sclerodermia, tiroidite autoimmune, morbo di Basedow, cirrosi biliare primitiva, pemfigoide bolloso, epatite autoimmune), 208 affetti da altre malattie non autoimmuni (gruppo C: malattie infettive, malattie infiammatorie intestinali, cirrosi epatiche volgari) e 120 soggetti sani (gruppo D). È stato impiegato un metodo immunoenzimatico manuale in fase solida (Aeskulisa tTG-A, Aesku.Diagnostics, Wendelsheim, Germania).

Risultati. Utilizzando come soglia di positività il valore di 18 UA/ml, derivato dall'analisi della curva ROC ottenuta sull'intera casistica, gli autoanticorpi anti-CTPD IgA sono risultati presenti in 79 su 81 pazienti del gruppo A (97.5%), in 14 su 486 pazienti del gruppo B (3.5%), in 7 su 206 pazienti del gruppo C (3.4%) e in 0 (0%) su 120 pazienti del gruppo D. La rilevazione di questa classe anticorpale ha evidenziato una sensibilità diagnostica del 97.5% sui pazienti celiaci non trattati, paragonabile, se non superiore, a quella dei consolidati marcatori diagnostici (EMA-IgA: 97.4%; tTG-IgA: 96.1%; anti-DGP IgA: 84.2%). Anche la specificità diagnostica, rilevata sui pazienti di controllo (gruppi B,C,D) è stata elevata, pari al 97.4%. Dei 21 pazienti positivi al test CTPD-IgA nel gruppo di controllo, 11 sono risultati positivi ai test classici per la diagnosi e quindi riscontrati affetti da celiachia (7 classiche e 4 silenti): la specificità diagnostica ridefinita ha raggiunto quindi il 98.8%.

Conclusioni. Per le caratteristiche fisiopatologiche e per l'accuratezza diagnostica, il dosaggio degli anticorpi anti-CTPD costituisce un affidabile test di screening per la diagnosi di celiachia, soprattutto per evidenziare precocemente soggetti affetti da celiachia subclinica (iceberg celiaco).

EFFICACIA DIAGNOSTICA DEL TEST ELISA PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPIANTI-PEPTIDI GLIADINICI DEAMIDATI

B-10

L. Terzuoli^{1,2}, R. Pagani^{1,2}, P. Rossi², L. Pieri², C. Scapellato², B. Porcelli^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Interna, Scienze-Endocrino Metaboliche e Biochimica, Università degli Studi di Siena, Siena

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

Scopo dello studio. La determinazione degli anticorpi diretti contro la transglutaminasi (tTG) e l'endomysio (EMA), grazie alla loro elevata specificità e sensibilità, rappresentano il miglior strumento per la diagnosi sierologica di malattia celiaca (CD) e dovrebbero aver sostituito in gran parte il dosaggio degli anticorpi anti-gliadina (AGA), meno specifici e sensibili. È stato infatti dimostrato che gli AGA possono ritrovarsi anche in altre patologie; nonostante ciò, è ancora molto in uso richiedere la determinazione di questi anticorpi nella popolazione adulta. Recenti studi hanno dimostrato che gli anticorpi diretti contro peptidi deamidati di gliadina (AGAd) potrebbero sostituire il vecchio test degli AGA. Nel nostro laboratorio è stata considerata questa possibilità e pertanto ne è stata valutata la performance diagnostica, rispetto agli AGA, tTG ed EMA.

Materiali e Metodi. 20 sieri di pazienti celiaci e 76 di soggetti controllo sono stati testati per il pannello: tTG, AGA, AGAd (sia IgA che IgG) ed EMA. tTG, AGA e AGAd sono stati determinati quantitativamente con test ELISA; EMA sono stati misurati con il metodo dell'immunofluorescenza indiretta. Tutti i kit sono stati forniti dalla Ditta Eurospital (Trieste). La diagnosi di celiachia nei soggetti con CD è stata confermata dalla biopsia duodenale. I soggetti del gruppo controllo sono stati a loro volta suddivisi in 10 donatori di sangue, 11 soggetti con epatopatia autoimmune, 5 con epatite/cirrosi, 11 con epatite/cirrosi virale, 39 con altre patologie del tratto gastroenterico.

Risultati. I risultati ottenuti con tTG IgA e EMA concordano perfettamente. I pazienti celiaci presentano sia le tTG che le AGAd, sia IgA che IgG, tutte positive (concordanza 100%), mentre 3 AGA IgA (concordanza 85%) e 7 AGA IgG (concordanza 65%) risultano negative. Nel gruppo controllo per la classe IgA: 9 AGA (concordanza 88%) e 2 AGAd (concordanza 97%) risultano positive, contro le tTG negative; per la classe IgG i valori sono piuttosto variabili per tutti e tre i test.

Conclusioni. Nel nostro studio si conferma la scarsa specificità e sensibilità degli AGA nella popolazione adulta. Questo test può essere validamente sostituito con il dosaggio degli AGAd, che hanno specificità e sensibilità paragonabile ai test tTG ed EMA. Per quanto riguarda i dosaggi degli anticorpi di classe IgG, questi dovrebbero essere usati solo in particolari condizioni, quali deficienza di IgA o casi dubbi, perché nella loro elevata variabilità non aggiungono ulteriori informazioni per la diagnosi di CD.

ASSESSMENT OF A COMBINATION SCREENING ASSAY

B-11

B. Porcelli^{1,2}, C. Scapellato², P. Rossi², L. Pieri², R. Pagani^{1,2}, L. Terzuoli^{1,2}

¹Department of Internal Medicine, Endocrine-Metabolic Science and Biochemistry, University of Siena, Siena

²Laboratory of Clinical Analysis, University Hospital Organization, Siena

Aim of the study. Recently, a serological screening assay for coeliac disease (CD), which detects simultaneously IgA and IgG anti-tissue transglutaminase (a-tTG) and deamidated gliadin peptide antibodies (a-DGP) has been developed. In this study, we establish the performance of this assay with a well-characterized cohort of patients to assess its utility in laboratory practice.

Materials and Methods. We enrolled 41 CD patients (25 adults and 16 children). Diagnosis of CD was based on histological and serological criteria. As a control population, we enrolled 12 patients with hepatitis, 35 with viral hepatitis, 15 with autoimmune hepatitis, 83 with other gastrointestinal diseases. We also tested 24 sex-matched normal controls. All sera were stored at -20°C until use. Samples were tested for:

a-tTg type IgA: ELISA (Eu-tTG IgA, Eurospital, Trieste, Italy).

a-tTg type IgG: ELISA (Eu-tTG IgG, Eurospital, Trieste, Italy).

a-DGP type IgA: ELISA (QUANTA Lite TM Gliadin IgA II, INOVA Diagnostic Inc., San Diego, CA).

a-DGP type IgG: ELISA (QUANTA Lite TM Gliadin IgG II, INOVA Diagnostic Inc., San Diego, CA).

IgA endomysial (EMA): IFI (Eurospital, Trieste, Italy).

IgA and IgG of a-tTG and a-DGP in a single assay (QUANTA Lite TM h-tTG/DGP Screen, INOVA Diagnostic Inc., San Diego, CA).

Results. In CD patients, h-tTG/DGP Screen, IgA a-tTG and EMA showed a 100% sensitivity, while IgG a-tTG was positive only in 78%, IgA a-DGP in 90% and IgG a-DGP in 88%. In the control population, h-tTG/DGP Screen was positive in 15 of the 169 (9%): in 4 cases (2.4%) Screen was positive alone, in another 11 controls (6.5%) its positivity was associated with positivity of IgA a-tTG and/or IgA a-DGP and/or IgG a-DGP.

Discussion and Conclusions. The new test recognized all the CD sera showing 100% of sensitivity; the specificity level has been comparable to the single assays. This study led to the development of a screening protocol, where the initial testing is performed on the sensitive combination screening assay. Samples found to be screen positive could be tested by specific, individual assays for confirmation. This strategy, effective and efficient in terms of costs, could resolve in laboratory practice the problem of a not appropriate use of serologic tests for CD, requested all together as analysis of first level for diagnosis of CD without following the flow chart recommended by laboratories.

DETECTION OF AUTOANTIBODIES AGAINST ACTIN FILAMENTS IN CELIAC DISEASE**B-12****B. Porcelli^{1,3}, C. Vindigni², C. Scapellato³, P. Rossi³, L. Pieri³, R. Pagani^{1,3}, S. Ugolini⁴, L. Terzuoli^{1,3}**¹Department of Internal Medicine, Endocrine-Metabolic Science and Biochemistry, University of Siena, Siena;²Pathological Anatomy 1, University Hospital Organization, Siena; ³Laboratory of Clinical Analysis, University Hospital Organization, Siena;⁴Eurospital SpA, Trieste

Aim of the study. Recently, Clemente et al reported that in patients with celiac disease (CD) circulating autoantibodies specifically directed toward the intracellular cytoskeleton actin filaments (anti-actin antibodies, AAA) correlate with the degree of intestinal villous atrophy (IVA). The objective of this study was to apply this assay to a well-selected cohort of patients and to assess the clinical utility of this method.

Materials and Methods. A total of 26 serum samples from CD patients were analyzed retrospectively for the presence of IgA-AAA. Positivity for anti-endomysial antibodies (EMA), anti-tissue transglutaminase (a-tTG) antibodies and severity of intestinal pathology were the inclusion criteria. Serum IgA a-tTG antibodies and IgA EMA were analyzed by commercial tests (Eurospital, Trieste, Italy). Serum IgA AAA were tested with an indirect immunofluorescence test (Eurospital, Trieste, Italy) which uses sections of rat intestinal epithelial cells. Intestinal biopsies were performed in the same period of CD serologic screening tests and were classified according to a modified version of Marsh's classification: 18 patients had total IVA (3C), 5 showed histopathology 3B and 3 had histopathology 3A.

Results. IgA-AAA were positive in 8 of the 18 (44.4%) patients with total IVA, and in 1 of the 5 (16.6%) patients with histopathology 3B. No positivity was revealed in patients with 3A.

Discussion and Conclusions. Our study show that IgA-AAA in serum are positive when there is the presence of advanced histological lesions. Compared with the report by Clemente et al we found a lower prevalence of IgA-AAA in CD patients, results which are very similar to those obtained by Granito et al. The positivity of IgA-AAA in the patients with severe villous atrophy suggests a their possible role in non invasive assessment of mucosal damage. This test could be helpful in patients who cannot undergo an intestinal biopsy for a severe contraindication, or in the case in which the clinician evaluates the possibility to execute the biopsy in particular categories of patients (children, subjects on diet), or in the case of difficult interpretation of intestinal lesion.

DIMINUZIONE DELLE CELLULE DENDRITICHE CIRCOLANTI NEI PAZIENTI USTIONATI**B-13****G. Amato, R. Mogavero, N. D'Arpa, A. Accardo-Palumbo, D. Pileri, M. Diquattro, L. D'Amelio, L. Bianchi, G. Ciofalo, M. Di Pisa, F. Lombino, M. Salvia, J. Tusa, B. Palma**

A.O.R.N.A.S. Civico-DiCristina-Benfratelli; U.O.C. Patologia clinica-Laboratorio di Immunobiologia e Citofluorimetria; U.O.C. Chirurgia plastica

Scopo del lavoro: L'ustione severa è associata a soppressione della risposta immune e a conseguente sviluppo di sepsi. La depressione della risposta immune si realizza con una defaillance dei linfociti Th1 e dei linfociti NK ed un decremento nella produzione di IFN. Le cellule dendritiche (DCs) sono potenti APC e giocano un ruolo chiave nella attivazione delle T-cell; esse sono essenziali nel coordinamento della risposta dell'ospite verso i patogeni. Il nostro obiettivo è stato lo studio del comportamento delle DCs nei pazienti ustionati che vanno incontro a sepsi.

Materiali e metodi: Usando la citometria a flusso a tre colori abbiamo determinato la percentuale dei LIN- DR+DCs negativi nei pazienti ustionati ed in soggetti sani. Sangue periferico di 9 pazienti ustionati è stato prelevato nei giorni 1, 3, 7, 10 e 14 e processato in citofluorimetria a flusso per lo studio della percentuale di DCs. Analogamente è stato fatto con i campioni di 9 soggetti sani. Sono stati utilizzati MoAb marcati con fluorocromi per preparare un lineage-cocktail: anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD56 ed anti-HLA-DR tutti della Becton Dickinson - Mountain View, CA. L'analisi citofluorinetrica è stata condotta con lo strumento FACSCalibur (Becton Dickinson).

Risultati: I pazienti sono stati considerati settici in base a criteri clinici ed ai seguenti criteri microbiologici: emocoltura o coltura tissutale positiva per batteri o miceti. L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il test di significatività statistica. La percentuale di DCs è più bassa nei pazienti settici che nei non settici per tutto il periodo esaminato (14 giorni) dopo l'episodio dell'ustione. Al contrario la percentuale di DCs nei pazienti non settici è bassa al 1° giorno, aumenta dal 3° al 10° giorno e ritorna a valori normali al 14° giorno.

Discussione e conclusioni: I dati dello studio presente suggeriscono che la percentuale di DCs decresce precocemente dopo l'ustione; ma in presenza di sepsi severa la percentuale di DCs rimane più bassa fino al 14° giorno. Questa riduzione delle DCs può contribuire alla immunosoppressione osservata dopo l'ustione.

CITOCHINE E ANTICORPI ANTI-RNAPoly III: UTILI BIOMARKERS IN CORSO DI MALATTIA DEL POLMONE SCLERODERMICO

B-14

P. Sabatini¹, I. Soriente¹, R. Iervolino¹, A. Sorrentino¹, Z. Senatore¹, M. Vitiello¹, G. Cicchitto²

¹U.O.C.di Patologia Clinica, P.O.Umberto I, Azienda Salerno

²U.O.C. di Fisiopatologia Respiratoria PO S. Maria Incoronata dell'Olmo, Azienda Salerno

Introduzione: La malattia interstiziale del polmone è una delle più comuni complicanze in corso di Sclerodermia (SSc), patologia caratterizzata da fibrosi progressiva del derma e degli organi interni. Molti pazienti con tosse non produttiva e progressiva diminuzione dell'attività respiratoria associata con un'evidente diminuzione del volume polmonare ed ipossia, presentano malattia del polmone sclerodermico (SLD). Le complicanze polmonari nella sclerodermia restano la più frequente causa di mortalità. Differenti cellule infiammatorie sono implicate nelle diverse fasi della malattia, linfociti, granulociti e macrofagi producono diverse citochine regolatrici che stimolano la proliferazione e l'attivazione di fibroblasti e la formazione di miofibroblasti, con un'eccessiva deposizione di matrice. Effettuare una diagnosi precoce è necessario per intraprendere una tempestiva ed efficace terapia per evitare effetti devastanti.

Scopo: E' stato valutato l'assetto bioumorale e la produzione di citochine infiammatorie in pazienti sospetti o affetti da SSc, con e senza interstiziopatia polmonare, per evidenziare biomarkers distintivi delle due forme.

Materiali e Metodi: Sono stati selezionati 60 pazienti, tra i 18 e i 70 anni di entrambi i sessi, 40 dei quali affetti o sospetti di SSc, di cui 20 con SLD e 20 pazienti sani di controllo. Tutti, ad eccezione dei 20 pazienti di controllo, presentavano un titolo antinucleare (ANA) con metodica di immunofluorescenza indiretta, maggiore di 1:320, con pattern nucleolare e negatività per gli anticorpi anti-Scl-70 e anti-centromero. I 20 pazienti con interstiziopatia polmonare sono stati sottoposti a BAL. Sul siero di tutti i pazienti e sul BAL sono stati dosati, gli anticorpi anti-RNA polimerasi III, il TNF- α , IL-6; IFN- γ con metodica ELISA.

Risultati: Il dosaggio degli anticorpi anti RNAPoly III effettuato sui campioni di siero risultava positivo per 6 dei pazienti con SSc senza interstiziopatia, per 10 pazienti con interstiziopatia e per nessuno dei donatori sani. Tutti i campioni di BAL risultavano negativi per gli anticorpi anti-RNA poly III. Il dosaggio delle citochine effettuato sul siero e sui BAL, positivi per gli anticorpi anti-RNA polyIII, mostrava 10 campioni positivi per IL-6, 4 per IFN- γ , e nessuno per TNF- α .

Discussioni e Conclusioni: La ricerca degli anticorpi anti-RNA polyIII come biomarkers di SSc, appare utile in caso di interessamento polmonare. Si conferma il ruolo della IL-6 come importante fattore di flogosi e di regolazione del processo implicato nella SLD in corso di SSc.

CARATTERIZZAZIONE DELLE POSITIVITA' FLUOROSCOPICHE PER ANTICORPI CONTRO GLI ORGANELLI VACUOLARI CELLULARI MEDIANTE TECNICHE NON CONVENZIONALI

B-15

C. Alpini¹, S. Avale¹, S. Valaperta⁴, R. Assandri⁴, M.G. Bottone², G. Santin², P. Veneroni², A.I. Scovassi³, A. Montanelli⁴, M. Malatesta⁵, G.B. Vadacca¹, R. Moratti¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia; ²Dipartimento di Biologia Animale, Laboratorio di Biologia Cellulare e Neurobiologia Università di Pavia; ³Istituto di Genetica Molecolare del CNR, Pavia;

⁴Laboratorio Analisi Cliniche IRCCS Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (Mi); ⁵Dipartimento di Scienze Morfologico-Biochimiche sez. Anatomia ed Istologia Università di Verona

Introduzione e scopo. La diagnostica di laboratorio delle M.A.I.S. si basa come primo step sull'osservazione in IFI degli anticorpi anti-nucleo e anti-citoplasma. Il riscontro della positività per autoanticorpi diretti verso i diversi organelli citoplasmatici (endosomi, lisosomi, apparato di Golgi e reticolo endoplasmatico) risulta di difficile caratterizzazione e rappresenta per il laboratorio un problema interpretativo e classificativo. Tranne che per il caratteristico pattern relativo all'apparato di Golgi, infatti, per tutti gli altri la morfologia da sola non è identificativa. Scopo del lavoro è stato quello di confermare e caratterizzare le specificità antigeniche di 9 quadri fluoroscopici citoplasmatici osservati in pazienti affetti da patologie autoimmuni e non.

Materiali e metodi. ANA in IFI: Vetrini di Hep-2 commerciali (Immuno Concepts, Euroimmun, INOVA) ed allestiti home made. ENA: EliA Phadia su strumentazione Immuno CAP250. Studio delle specificità antigeniche: Microscopia Elettronica e tecniche immunostochimiche su Hep-2 in coltura e Western Blot dedicati.

Risultati. In IFI i 9 campioni sono risultati negativi per ANA e ENA e positivi per anti-citoplasma. Le tecniche di ricerca hanno individuato la presenza di Abs verso il complesso del Golgi (giantin/macrogolgin, golgin-245, golgin-160) e verso i complessi antigenici propri degli endosomi, lisosomi e del reticolo endoplasmatico.

Conclusioni. Le positività osservate in IFI sono state tutte confermate dai successivi step di ricerca. Questi risultati ci inducono a sottolineare che l'IFI è irrinunciabile, ma che al contempo deve trovare il supporto, anche nell'ambito del laboratorio clinico, di procedure analitiche che consentano di tipizzare le positività anticorpali verso le strutture antigeniche extra-nucleari. La raccolta di casistiche più ampie consentirà al laboratorio di realizzare interpretazioni diagnostiche ancora più accurate e di fornire al clinico un nuovo efficace strumento per migliorare il percorso diagnostico-terapeutico del paziente.

Bibliografia. Stinton L.M., Fritzler M.J. Autoantibody to protein transport and messenger RNA processing pathways: endosomes, lysosomes, Golgi complex, proteasomes, assemblyosomes, exosomes and GW bodies. Clinical Immunology, 110 (2004): 30-44.

GLIAUTOANTICORPI: UTILI MARCATORI BIOUMORALI NELLA SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI (APS) NEL “GENERE FEMMINILE”

B-16

P. Sabatini¹, R. Iervolino¹, A. Sorrentino¹, A. Vitagliano², I. Soriente¹, L. Clemente²

¹U.O.C.di Patologia Clinica, P.O.Umberto I, Azienda Salerno

²Facoltà di Medicina e Chirurgia, Azienda Ospedaliera “Careggi” Firenze

Scopo: Le malattie autoimmuni sono malattie di genere in quanto colpiscono prevalentemente le donne in età fertile. Il genere è una costruzione sociale, che diversamente dal sesso incide sull’“health outcome”. In corso di Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi (APS) gli anticorpi antifosfolipidi attaccano proteine leganti i fosfolipidi coinvolte nel controllo della coagulazione come la β 2 glicoproteina I, la cardioplipina, l’annessina V e la protrombina, causando trombosi e perdite fetali. E’ apparso interessante verificare l’utilità di specifici profili diagnostici in pazienti di genere femminile con sospetto o affette da APS, la prevalenza degli anticorpi anti-annessina V e anti-protrombina nelle donne con complicanze ostetriche e verificare la funzione dei D-Dimeri, già utili marcatori di eventi trombotici.

Materiali e metodi: Sono state arruolate 140 donne tra i 18 e i 60 anni, di cui 30 in età fertile con sospetto clinico di APS, 30 ricoverate presso il reparto di Ostetricia e Ginecologia per aborti o complicanze ostetriche, 30 in menopausa e 50 donatrici sane. I gruppi selezionati sono stati sottoposti a prove coagulative su plasma: aPTT, Lupus Anticoagulant (LAC) e dosaggio dei D-Dimeri. La ricerca su siero degli anticorpi anti-Cardiolipina e anti- β 2 glicoproteina I di isotipo IgG e IgM è stato eseguito con metodica FEIA e quello degli anticorpi anti-Annessina V e anti-Protrombina di isotipo IgG e IgM con metodica EIA.

Risultati: I dati ottenuti hanno confermato la presenza di diverse categorie di profili anticorpali in corso di APS. L’analisi statistica dei dati ha confermato l’utilità dei test criterio e ha rivelato una elevata capacità discriminante ($p < 0,0001$) per il dosaggio degli anticorpi anti-annessina V e per il test del D-dimero. Infine, il dosaggio degli anticorpi antiprotrombina, isotipo IgG, appare significativo per le donne con complicanze ostetriche.

Conclusioni: I risultati ottenuti evidenziano l’importanza di utilizzare nel sospetto di APS, dei “profili diagnostici dedicati per genere”, volti a ridurre l’errore diagnostico, in sintonia con una moderna visione del concetto di salute che tenga conto del genere. La presenza di elevati titoli di anticorpi antiannessina V e antiprotrombina in donne con aborti o complicanze ostetriche, ne confermano l’utilità diagnostica in caso di aborti ripetuti. La presenza di elevati livelli di D-Dimeri, potrebbe rappresentare un test da affiancare ai test criterio per la diagnosi di APS.

SEARCH OF AUTOANTIBODIES AGAINST ISLET CELL ANTIGENS AFTER THERAPY WITH INTERFERON α IN PATIENTS WITH HCV INFECTION: PRELIMINARY DATA

B-17

M. Liguori, P. Mastio, C. Giannetti, L. Murgia, M.D. Salici, C. Marinelli, C. Crociani, M. Di Rosa, A. Lubelli, P. Meloni, M. Angius

Laboratory Medicine Department. Azienda Ospedaliera “G. Brotzu” Cagliari. Italy

Aim of the study: Sardinia is, together with Finland, the region in the world with higher risk of type 1 diabetes. Various types of viruses, among which the HCV (with higher prevalence in South Italy than the rest of country) are considered environmental factors causing diabetes. Moreover, Interferon treatment for hepatitis can cause autoimmune diabetes. For such reasons we have considered useful the detection of autoantibodies against Glutamic Acid Decarboxylase (GADA), Tyrosine phosphatase (IA2) and ICA (Islet Cells Autoantibodies) in patient with HCV infection after therapy with interferon.

Methods: Sixty four HCV positive patients (age range= 33-77) on interferon treatment were examined (37.5%) female, mean age=58 (SD=11). Fifty healthy donors were also tested.

HCV-RNA were measured by the PCR real-time assay kit Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 48 HCV (CAP/CTM; Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, CA). GADA and IA2 were detected using the following kits: Anti-GAD ELISA IgG and Anti-IA2 ELISA IgG (Euroimmun AG, Luebeck, Germany). In the Diabetes Autoantibody Standardization Program it obtained results comparable to the RIA. Such tests were performed in the EUROIMMUN Analyzer I, while ICA tests were detected with IFI method. All the detections were accomplished by the manufacturers protocols.

Results: GADA: at the cut-off recommended by manufacturer (>10 IU/ml) 92% of the patients resulted positive. In details: 29.6% between 10 and 30 IU/ml, 25.0% between 30 and 70 IU/ml and 35.8% between 70 and >200 IU/ml. In the healthy donors: 20.0 % between 10 and 20 IU/ml and 6.0% between 20 e 30 IU/ml. For the IA2: all subjects were negative. Three percent of the patients were ICA positive.

Conclusions: Although we think it would be necessary to re-calculate the cut-off in our population, the prevalence of GADA we found is bigger than the one reported in the most recent literature (10.6%). For such reasons we are carrying on further investigations. Finally, we considered useful to detect autoantibodies against islet cell antigens before and after therapy with interferon.

DIAGNOSTICA DEDICATA AD UNA COMPLESSA PATOLOGIA AUTOIMMUNE: LA SINDROME DA ANTICORPI ANTI-FOSFOLIPIDI (APS)

B-18

A. Sorrentino, L. Clemente, R. Iervolino, B. Sessa, I. Soriente, Z. Senatore, P. Sabatini

U.O.C. Patologia Clinica, D.E.A.II Umberto I-Nocera Inferiore-A.S.L.SA1

Scopo del lavoro: La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è una patologia autoimmune sistemica caratterizzata da trombosi arteriose e venose, perdite fetali e piastrinopenia, associata alla presenza di un gruppo eterogeneo di anticorpi rivolti essenzialmente contro proteine leganti i fosfolipidi che regolano la coagulazione. L'APS è una sindrome complessa difficile da diagnosticare in maniera precoce. È apparso interessante dosare gli anticorpi anti-cardiolipina (ACA) e anti-β2glicoproteina I (aβ2GPI), marcatori precoci per la diagnosi e utili per il monitoraggio di pazienti sospetti o affetti da APS, con l'utilizzo di diversi metodi diagnostici per definire con maggiore approssimazione i valori di normalità per la nostra popolazione di afferenza.

Materiali e metodi: 134 pazienti, tra i 20 e i 70 anni, reclutati tra gennaio 2007 e maggio 2009, comprendenti 63 donne e 21 uomini con sospetto clinico di APS e 50 soggetti sani come gruppo di controllo, sono stati sottoposti al dosaggio dei tre test criterio per la diagnosi di APS. Le prove coagulative: tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT), lupus anticoagulant (LAC) sono state effettuate su plasma, mentre il dosaggio degli anticorpi anti-cardiolipina e anti-β2glicoproteina I di isotipo IgG e IgM è stato eseguito con metodica Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) utilizzando kit diagnostici di differente produzione e con metodica Fluorescence Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (FEIA).

Risultati: I dati ottenuti sottoposti ad analisi statistica mediante l'elaborazione di curve ROC hanno mostrato un diverso valore di sensibilità e di specificità per i dosaggi degli anticorpi anti-cardiolipina e anti-β2glicoproteina I effettuati con metodica ELISA, mediante kit di differente produzione. Per la metodica FEIA il dosaggio degli anticorpi anti-cardiolipina e anti-β2glicoproteina I, di entrambi gli isotipi, risulta avere un valore altamente discriminante ($p < 0,0001$) rispetto ai dosaggi effettuati in ELISA.

Conclusioni: Lo studio condotto ha evidenziato che per il dosaggio degli anticorpi anti-cardiolipina e anti-β2glicoproteina I il metodo FEIA risulta essere più efficiente rispetto al metodo ELISA. L'esistenza di diverse categorie di profili anticorpali conferma la presenza di differenti subset di pazienti e che l'APS colpisce maggiormente le donne in età fertile. Il dosaggio di marcatori biomorali specifici e mirati appare essenziale per una diagnosi precoce, efficace ed efficiente in corso di APS.

IL-17 UN NUOVO MARCATORE DI LABORATORIO DEL MECCANISMO PATOGENETICO DELLA PSORIASI

B-19

M.G. Scarmozzino, T. Pecora, A. Alimondi¹, U. Bottoni¹, V. Ventura

Cattedra di Patologia Clinica, ¹Cattedra di Dermatologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "Magna Graecia" di Catanzaro

L'attività fondamentale della medicina di laboratorio è quella di fornire parametri validi e riproducibili per la valutazione dei meccanismi patogenetici delle malattie. La Psoriasi, nella forma clinica comune ed in quella artritica, rappresenta una malattia autoimmunitaria, cronica, invalidante nella quale i Linfociti T CD4+ Th17 e le citochine ad essi correlate IL-17, IL-21, IL-22 svolgono un ruolo fondamentale.

Scopo del lavoro: Il nostro progetto di ricerca è quello di valutare, in questa malattia caratterizzata da alterata/persistente risposta flogistica, il profilo citochinico quale possibile marcatore dei meccanismi di flogosi e lesione epiteliale e la sua variazione, in termini predittivi, della possibile remissione clinica della malattia in seguito a terapia specifica oppure della sua riattivazione.

Materiali e metodi: 30 pazienti affetti da Psoriasi comune sono stati valutati, sul piano clinico e laboratoristico, al momento della diagnosi iniziale e dopo almeno trenta e fino a sessanta giorni di terapia. I campioni di plasma sono stati conservati a -80°C e scongelati all'uso. I dosaggi di IL-17, IL-6 sono stati effettuati con metodologia Elisa (kit Diaclone).

Risultati: I pazienti sono stati classificati clinicamente in base al valore dell'indice di severità PASI (basso, medio < 20; grave > 20). Il valore medio dei dosaggi plasmatici delle citochine al momento della diagnosi (t0) ed a quello finale dello studio (tF) ha mostrato una variazione concorde con quella del PASI, con una marcata diminuzione dei livelli di IL-17 nei pazienti che hanno avuto un significativo miglioramento clinico. IL-17 varia da un valore medio di 34.5 pg/ml al t0 ad un valore di 5.2 pg/ml al tF. Nei pazienti che non hanno avuto beneficio dal trattamento terapeutico sia IL-6 sia IL-17 non hanno mostrato variazione degli elevati livelli iniziali.

Discussione e conclusioni: I dati da noi ottenuti nei pazienti al momento della diagnosi clinica in fase acuta di malattia dimostrano che il profilo citochinico è tipicamente indicativo di alterata reattività immunologica con preponderanza di citochine proflogogene. In particolare, IL-17 rappresenta il marker biologico più specifico della attivazione di Th17 e, quindi, della attività flogogena ed immunopatologica alla base del meccanismo patogenetico della lesione epiteliale. La persistenza di valori elevati di questa citochina correla con l'andamento clinico della malattia. L'ampliamento del profilo citochinico consentirà di costruire un algoritmo di laboratorio specifico per il singolo paziente.

L'AUTOMAZIONE LEGGERA NELLA DIAGNOSI DELLE MALATTIE AUTOIMMUNI: VALUTAZIONE DI UN NUOVO METODO MULTIPLEX PER LO SCREENING E IL DOSAGGIO QUANTITATIVO DEGLI AUTOANTICORPI NUCLEO-CITOPLASMATICI

B-20

R. Tozzoli^{1,2}, G. Kodermaz², A. Perosa², D. Bassetti¹

¹Gruppo di Studio Autoimmunologia e Allergologia SIMeL

²Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Ospedale di Latisana (Udine)

Scopo del lavoro. Abbiamo studiato l'accuratezza diagnostica (sensibilità e specificità) di un nuovo sistema analitico a determinazione multipla per il dosaggio degli anticorpi antinucleo in un vasto gruppo di pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche e organo-specifiche.

Metodi. Sono stati studiati 498 pazienti, di cui 259 affetti da malattie reumatiche autoimmuni (96 LES, 52 SSc, 51 AR, 18 SS, 8 PM, 34 connettiviti indifferenziate), 89 affetti da malattie autoimmuni d'organo (52 tiroiditi linfocitarie, 28 morbo di Basedow, 9 malattie autoimmuni del tratto gastro-enterico) e 150 individui di controllo (100 soggetti sani, 50 affetti da malattie infettive). È stato impiegato il sistema analitico AtheNA Multi-Lyte e i reagenti ANA-III Plus (Zeus-Lagitre, Milano), che permettono la determinazione simultanea di 10 autoanticorpi nucleo-citoplasmatici (dsDNA, SSA-52, SSA-60, SSB, RNP, Sm, Scl-70, Jo-1, CENP-B, proteina P ribosomiale): il sistema, ad automazione discreta, si basa sulla tecnologia multiplex a microarray (microsfere indirizzate). Il numero totale delle determinazioni autoanticorpali è stato di 5500, eseguite in un tempo totale di circa 25 ore. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando le tecniche analitiche convenzionali di immunofluorescenza indiretta (IFI) e immunoenzimatica (ELISA) e con quelli ottenuti con un altro sistema analitico multiplex (MBA), basato sugli stessi principi metodologici.

Risultati. I valori soglia dei singoli autoanticorpi sono stati definiti mediante l'impiego delle curve ROC ottenute sull'intera casistica. I cut-off ottenuti sono stati diversi rispetto a quelli proposti dal produttore (in particolare per dsDNA). La specificità diagnostica del metodo, valutata nel gruppo di controllo, è risultata oscillare tra 96.9% (SSA-52, P-ribosomiale) e 100% (Sm, Scl-70). La sensibilità diagnostica, valutata sui pazienti affetti da malattie reumatiche, era compresa tra 12.5% (SSB) e 58.2% (dsDNA) per il LES, tra 6% (SSB) e 69.2% (CENP-B) per SSc e tra 55% (SSB) e 88.9% (SSA-60 e SSA-52) per SS, in linea con i dati di letteratura. La concordanza dei risultati è risultata pari all'88% ($k=0.72$) con il metodo convenzionale ANA-IFI, del 94.3% ($k=0.88$) con i metodi ENA-ELISA convenzionali e del 98.7% ($k=0.93$) con il metodo MBA.

Conclusioni. Il dosaggio degli autoanticorpi nucleo-citoplasmatici con il sistema analitico AtheNA Multi-Lyte associa buona capacità analitica e adeguata accuratezza diagnostica e può rappresentare, anche per i costi contenuti, una reale alternativa ai metodi convenzionali.

ONE-STEP IMMUNOCHROMATOGRAPHIC VISUAL ASSAY IN ORGAN CULTURE SYSTEM: AN USEFUL TOOL IN THE DIAGNOSTIC WORK-UP OF CELIAC DISEASE

B-21

M. Di Tola, V. Libanori, D. De Nitto, M. Marino, R. Borghini, G. Donato¹, L. Scandone², O. De Luca³, F. Tabacco⁴, R. Amodeo⁴, M. Ruggeri⁵, A. Picarelli

Department of Clinical Sciences and ¹Department of Clinical Medicine, University Sapienza of Rome; ²Central Laboratory, Main Hospital of Tivoli; ³UOD Advanced Molecular Diagnostics and ⁴UOC Laboratory Diagnostics, S. Andrea Hospital of Rome; ⁵Department of Clinical Pathology, S. Giovanni Hospital of Rome

Aim of the study: Detection of anti-endomysial (EMA) and anti-tissue transglutaminase (anti-tTG) in culture media of duodenal biopsies has been proposed in the diagnostic work-up of celiac disease (CD), even if some operative difficulty have limited its widespread use. To improve the management of this organ culture system, we evaluated the occurrence of anti-tTG by an immunochromatographic assay (ICA).

Methods: 103 CD patients (23M/80F, 34.6±10.2 yrs) and 41 disease controls (9M/32F, 36.0±14.1 yrs) were recruited. For each patient, a duodenal biopsy was cultured at 37°C for 48 hrs. In culture media, IgA EMA were searched by indirect immunofluorescence analysis (IFA) and results were expressed as positive/negative. IgA anti-tTG were measured by enzyme immune assay (EIA), results were expressed in absorbance (A450nm) and the mean value of controls +3SD was used as cut-off to identify positive results. IgA anti-tTG were also evaluated by ICA. In brief, sticks containing latex particles conjugated to tTG were incubated in culture media for 5 min, so that the resulting particle-anti-tTG complexes moved up to an area rich of tTG that, reacting with them, determined the appearance of an indicative line. Results were expressed as positive/negative and, in relation to the intensity of indicative lines, arbitrary scores from 1 to 4 were assigned. Statistical analysis were performed by Spearman rank correlation.

Results: EMA and anti-tTG measured by EIA were positive in culture media of all CD patients, anti-tTG detected by ICA were positive in culture media of 87/103 CD patients. Anti-tTG EIA values significantly correlated with anti-tTG ICA scores ($r=0.71$, $p<0.0001$). Sensitivity, specificity, positive/negative predictive values and diagnostic accuracy of EMA and anti-tTG measured by EIA were 100% while, for anti-tTG detected by ICA, these parameters were 84.5%, 100%, 100%, 71.9% and 88.9%, respectively.

Conclusions: Data highlight that, by using ICA, anti-tTG are detectable in duodenal culture media of most CD patients and that the intensity of indicative lines depends by the anti-tTG concentration. Sensitivity, negative predictive value and diagnostic accuracy achieved with ICA are lower than those obtained with EIA but, given that the first is a more easy and prompt method compared with the second, data suggest the possibility of use ICA in the in vitro diagnosis of CD.

IMPORTANCE OF PEPTIDES DEAMIDATED IN THE CELIAC DISEASE**B-22****R. Faricelli, S. Campli, A. Ciaramellano, M. Di Mascio, S. Esposito, R. Mancinelli, M. Flacco, S. Troiano**

Clinical Pathology - Policlinico SS. Annunziata - Chieti

Aim of the study: The serologic diagnosis of the celiac disease uses also the search of IgA and IgG antibodies against gliadin. In order to improve the performance of the antibodies anti Deamidated Gliadin Peptides (DGP-AGA) that linked to the trap of microtitulation like antigen, it does not introduce pure α -gliadin but deamidated gluten fragments, thus like physiological.

For the low specificity of the antibodies against gliadin "method classic", it is a fraction of population IgG positive, but that it is celiac (DGP-AGA negative and other tests for Celiac Disease negatives). Why do exist people apparently "healthies" with IgG antibodies against gliadin "classic method" positive?

Methods. Serum samples from 15 patients of inferior age to the 6 years positives for antibodies against gliadin "classic method", negatives for antibodies against endomysium and antibodies anti Deamidated Gliadin Peptides IgA and IgG. The first control group comprised 7 children from 1 to 6 years old, that were positives to all the markers for the celiac disease. The second control group comprised 20 healthy patients from 1 to 6 years old, all negatives for antibodies TTG IgA and IgG, antibodies against endomysium, antibodies against gliadin "classic method" and antibodies anti Deamidated Gliadin Peptides IgA and IgG.

Results. The 15 considered patients, negatives to antibodies anti Deamidated Gliadin Peptides IgA and IgG, are antibodies against gliadin "classic method" positives, which had alimentary allergies, other autoimmune pathologies or other gastroenteric disease.

Conclusions. Those will have antibodies against gliadin IgG "classic method" positives and antibodies anti Deamidated Gliadin Peptides IgG negatives will have to be under way to ulterior searches for alimentary intolerances and/or allergies. It is opportune to control a consistent number of gastroenterologic patients with a suspect for celiac disease.

Bibliography. Skovbjerg H., Anthonen D., Knudsen E., Sjoström H. Deamidation of gliadin peptides in lamina propria: implications for celiac disease. Dig Dis Sci 2008 Nov; 53(11): 2917-24

SCLERODERMIA E SISTEMA DI ATTIVAZIONE DEL PLASMINOGENO: DETERMINAZIONE DEI COMPONENTI UROCHINASI/RECETTORE UROCHINASI IN FIBROBLASTI DI PAZIENTI AFFETTI DA SSc**B-23****L. Postiglione¹, N. Montuori¹, G. Di Spigna¹, A. Riccio², D. Carnevale¹, G. Rossi¹, P. Ragno³**

¹Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Napoli "Federico II", ³Dipartimento di Chimica, Università di Salerno, Italia

Scopo dello studio: La Sclerosi Sistemica (SSc) è una patologia cronica autoimmune caratterizzata da una intensa risposta infiammatoria e da una marcata iperattività fibroblastica. Nell'infiammazione il sistema di attivazione del plasminogeno urochinasasi-dipendente (uPA) gioca un ruolo importante nella fibrinolisi e nell'attivazione e chemiotassi dei neutrofili e linfociti. Lo scopo di questo studio è quello di valutare l'espressione di tale sistema uPA-dipendente in 12 pazienti affetti da SSc, sia della forma diffusa (dSSc) che limitata (ISSc).

Materiali e Metodi: L'espressione di alcuni componenti del sistema di attivazione del plasminogeno uPA-dipendente in fibroblasti normali di derma (N=10) e di pazienti affetti da SSc (N=12), provenienti sia dalle aree coinvolte che non coinvolte, sono stati esaminati mediante Western blot. Mediante saggi di adesione cellulare è stata valutata anche l'adesione degli stessi fibroblasti alla vitronectina.

Risultati: L'analisi con Western blot mostra un incremento dei livelli dell'uPAR nei fibroblasti delle aree coinvolte dei pazienti ISSc, rispetto ai controlli. I livelli dell'uPAR nei fibroblasti delle aree non coinvolte appaiono simili a quelli dei controlli. In contrasto i livelli dell'uPAR nei fibroblasti delle aree coinvolte dei pazienti dSSc non variano se paragonati ai fibroblasti di controllo, mentre si osserva un incremento dei livelli dell'uPAR nelle aree non coinvolte. Le colture di fibroblasti "in vitro" ottenute dai pazienti affetti da ISSc mostrano un generale incremento della secrezione di uPA e PAI1 e un decremento di PAI2. Gli esperimenti di adesione mostrano che i fibroblasti dei pazienti affetti da SSc aderiscono alla vitronectina meno efficientemente rispetto al controllo.

Discussione e Conclusioni: I nostri risultati mostrano un incremento dell'espressione dell'uPAR in fibroblasti da dSSc. Nelle aree coinvolte in ISSc è dimostrato un incremento sia di PAI1 che di uPA. L'aumentata espressione di PAI1 può giocare un ruolo importante nell'accumulo di collagene, mentre un aumento dell'espressione di uPA potrebbe essere relazionata ad un suo effetto protettivo sulla fibrosi ricollegabile all'attivazione di metalloproteasi. Una bassa adesione dei fibroblasti SSc alla vitronectina potrebbe essere associata ad una azione inibitoria dell'uPAR sull'attività integrinica. Questi risultati indicano un'importante coinvolgimento del sistema di attivazione del plasminogeno uPA-dipendente nei fibroblasti di derma SSc.

VALUTAZIONE DELL'ERRORE ALL'INTERFACCIA LABORATORIO-CLINICA: L'ESEMPIO DEL TEST ANTI-ENA

B-24

A. Zucano, M. Tampoia, V. Brescia, A. Fontana, A. Massaro, A. Calamita, M.C. Petrelli, F. Di Serio

U.O. Patologia Clinica I, Policlinico di Bari

Introduzione. Una integrazione efficace tra laboratorio e clinica è cruciale per migliorare le conoscenze sugli errori di laboratorio[1], anche in autoimmunologia. Scopo del lavoro è stato quello di valutare il rischio clinico correlato alla probabile non esecuzione del test anti-ENA, in soggetti ANA negativi o positivi a basso titolo.

Materiali e metodi. Sono state valutate 1068 richieste/pazienti, 602 provenienti al laboratorio con chiara indicazione clinica di patologia autoimmune sistemica, 466 senza alcuna indicazione. Su tutti i campioni è stata eseguita la determinazione degli ANA in immunofluorescenza indiretta e la ricerca degli autoanticorpi anti-ENA con metodica immunoenzimatica.

Risultati. 5/219(2.3%) pazienti ANA negativi e 9/142(6.3%) ANA positivi a basso titolo con sospetta patologia autoimmune hanno mostrato positività ad uno o più autoanticorpi anti-ENA. 7/190(3.7%) pazienti ANA negativi ed 8/112(7.1%) ANA positivi a titolo $\leq 1:160$ senza indicazione clinica sono risultati positivi al test anti-ENA. La percentuale di positività anti-ENA tra i due gruppi non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa, tranne che per i pazienti ANA positivi a titolo elevato (chi-quadro, $P < 0.0001$). La revisione clinica dei casi ANA negativi o a basso titolo ed anti-ENA positivi ha accertato diagnosi di patologia autoimmune sistemica in 6 pazienti pervenuti con chiara indicazione clinica, 2 ANA negativi (0.9%) (anti-Jo1, anti-SSA) e 4 ANA positivi a basso titolo (2.8%) (anti-SSA ed anti-SSB). Nessuno dei pazienti anti-ENA positivi (10 anti-SSB, 3 anti-SSA, 1 anti-SSb ed anti-Scl-70, 1 anti-Sm) senza indicazione clinica presentava malattia autoimmune sistemica.

Conclusione. La percentuale di positività al test anti-ENA in campioni ANA negativi o positivi a basso titolo identifica un rischio di errore nella diagnosi di patologia autoimmune sistemica. La nostra esperienza ha dimostrato che tale rischio può essere contenuto attraverso il miglioramento dell'interfaccia laboratorio-clinica in termini di appropriatezza della richiesta ed appropriata interpretazione ed uso del risultato del test.

Bibliografia. [1] Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? Clin Chem Lab Med 2006; 44:750-9.

MALATTIA DA CATENE PESANTI γ ASSOCIATA A MALATTIA AUTOIMMUNE

B-25

M. Ruggeri¹, B. Anaclerico², F. Bottan¹, S. Fenu², C. Maida¹, P. Spiridigliozzi¹

¹A. O. S. Giovanni -Addolorata Medicina di Laboratorio; ²A. O. S. Giovanni -Addolorata Ematologia

Scopo del lavoro. La malattia da catena pesante γ , scoperta da Franklin nel 1963, è un'entità rara ed è caratterizzata dalla produzione di catene pesanti monoclonali libere senza la concomitante produzione di catene leggere.

Si presenta con le caratteristiche cliniche di un linfoma e a questa forma possono essere associate alcune malattie croniche come l'AR, la sindrome di Sjögren, il LES, la TBC, la Miastenia Gravis, la sindrome Iperesinofila, l'Anemia Emolitica Autoimmune e la Tiroidite. Considerata la scarsa incidenza di tale condizione, riferiamo un caso da noi osservato.

Materiale e metodi. Donna di 71 anni dal 1989 in trattamento con immunosoppressori perché affetta da artrite reumatoide, a seguito di un controllo eseguito nel nostro laboratorio, all'elettroforesi sierica (Capillarys Sebia) veniva riscontrata una esigua componente monoclonale in zona gamma centrale. L'immunofissazione sierica e urinaria (Sebia) mostrava la presenza di catena pesante γ monoclonale esattamente corrispondente per mobilità elettroforetica e specificità immunologica. Alla biopsia osteomidollare la paziente presentava un quadro normocellulare con serie eritroide iperplastica e diseritropoietica. E' stato eseguito uno studio completo, con risultato negativo, per evidenziare l'eventuale presenza di una massa mielomatosa, linfomatosa o l'amiloidosi. La paziente è monitorizzata dal punto di vista clinico e non è stato iniziato nessun trattamento. Gli esami ematochimici hanno evidenziato una riduzione delle IgM sieriche (17 mg/dL), anemia lieve (Hb 10.8 g/dL) un lieve rialzo della creatinina (1,56 mg./dL), un lieve aumento della PCR (1,21 mg./dL) e della beta 2 microglobulina (3,3 mg./dL), Rf e CCP negativi e aumento della sottoclasse IgG3 (1350 mg/dL).

Discussione e conclusioni. Nonostante siano stati descritti pochi casi di Malattia da catena pesante γ , risulta di cruciale importanza per la diagnosi, il riscontro di una esigua componente monoclonale all'elettroforesi e la successiva dimostrazione all'immunofissazione di catene pesanti monoclonali nel siero e nelle urine, senza una concomitante produzione di catene leggere. Questo è un caso di AR sieronegativa in terapia da lungo tempo con immunosoppressori in cui la componente monoclonale si è riscontrata solo da pochi mesi o è l'elettroforesi capillare che ci ha permesso di evidenziarla? Rimane comunque da chiarire se la presenza della malattia da catene pesanti possa essere la conseguenza della malattia autoimmune primitiva o della prolungata terapia immunosoppressiva.

IL DOSAGGIO DEGLI ANTICORPIANTI-RECETTORE DEL TSH IN COMPLETA AUTOMAZIONE: UNA NUOVA FRONTIERA NELLA DIAGNOSTICA DELLE TIREOPATIE AUTOIMMUNI

B-26

R. Tozzoli^{1,2}, G. Kodermaz², D. Villalta¹, G.P. Pesce¹, M. Bagnasco¹

¹Gruppo di Studio Autoimmunologia e Allergologia SIMeL

²Laboratorio Analisi Chimico-cliniche, Ospedale di Latisana (Ud)

Scopo del lavoro. Negli ultimi anni numerosi progressi sono stati realizzati nei metodi di dosaggio degli anticorpi anti-recettore del TSH (TRAb), principali marcatori autoanticorpali del morbo di Basedow (MB). In particolare l'introduzione dell'anticorpo monoclonale M22 caratterizza la terza generazione dei dosaggi recettoriali dei TRAb, che tuttavia presentano ancora un'elevata complessità delle procedure analitiche, scarsamente automatizzabili. Scopo del presente studio multicentrico è stata la valutazione delle caratteristiche di un nuovo metodo immunometrico automatizzato di dosaggio dei TRAb in un vasto gruppo di pazienti affetti da tireopatie autoimmuni ed il suo confronto con i metodi di seconda generazione.

Metodi. Sono stati studiati 590 pazienti (106 soggetti sani, 52 pazienti affetti da malattie infettive, 58 pazienti affetti da tiroiditi autoimmuni, 72 pazienti affetti da MB, 302 pazienti ipertiroidi consecutivamente afflitti a due diversi Laboratori di diagnostica tiroidea). È stato impiegato il sistema analitico completamente automatico RAD 120 (Radim, Pomezia), che utilizza un metodo immunofluorimetrico caratterizzato da: fase solida costituita da particelle magnetiche sensibilizzate con recettore del TSH porcino; tracciante costituito dall'anticorpo monoclonale M22 coniugato con fosfatasi alcalina; substrato costituito da 4-metilumbelliferone fosfato. Come controllo è stato impiegato un metodo luminorecettoriale (LRA) manuale di seconda generazione (Lumitest TRAK, Brahms Diagnostica, Berlino, Germania).

Risultati. La sensibilità funzionale del metodo automatizzato (CV 10% nel profilo di imprecisione) si è assestata a 0.4 UI/L. La precisione analitica è stata: 3.4%-10.0% nella serie, 11.9-14.6 tra serie. Il valore soglia di positività è stato fissato a 1.25 UI/L mediante curva ROC sui risultati dei pazienti affetti da MB (72) e sui pazienti di controllo (158). La specificità è risultata essere del 97% e la sensibilità del 95%. Dei 302 pazienti ipertiroidi consecutivi, 79 (26.2%) sono risultati positivi al test, mentre solamente 57 (19.2%) erano positivi al test LRA di seconda generazione. Anche 12 su 58 (20.7%) pazienti affetti da tiroiditi autoimmuni è risultata essere positiva al test.

Conclusioni. Il metodo automatizzato di dosaggio dei TRAb presenta elevata sensibilità sia nei pazienti affetti da morbo di Basedow, che nei pazienti ipertiroidi, nei quali è in grado di individuare circa il 25% di pazienti affetti da ipertiroidismo autoimmune: dai dati del presente studio emerge una superiore sensibilità e precisione del metodo automatizzato rispetto al metodo LRA manuale di seconda generazione.

L'IMPORTANZA DELL'ESAME COPROPARASSITOLOGICO NELLA DIAGNOSTICA ALLERGOLOGICA. CASE REPORT

B-27

L. Bettoni, L. Manisco, B. Milanese

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. Desenzano del Garda (BS)

Scopo dello studio. Lo studio si propone di sottolineare l'importanza della diagnosi eziologica nelle malattie allergologiche, condizione necessaria ad una pianificazione terapeutica ottimale.

Pazienti e Metodi. In questo case-report si descrive il caso di G.E., una ragazza di 27 anni affetta da episodi pressoché quotidiani di angioedema localizzato al volto, giunta alla nostra osservazione con diagnosi di "Sindrome orticaria/angioedema cronica idiopatica". Le manifestazioni erano iniziate nel 2006 ma, nonostante la paziente abbia eseguito numerosi accertamenti, non è mai stato evidenziato alcun meccanismo patogenetico sotteso. La terapia suggerita era a base di antistaminici che, fornendo un controllo solo parziale dell'angioedema, venivano assunti sporadicamente. Anamnesticamente la paziente è fumatrice (10 sigarette/die), nullipara, alvo e diuresi normali. Assume da circa 10 anni un estroprogestinico orale a basso dosaggio ormonale.

Risultati. La paziente è stata da noi sottoposta, in regime di DH, ad esami e test allergologici da cui ne è risultata una pollinosi, peraltro paucisintomatica, nei confronti degli acari maggiori ed un marcato incremento di IgE totali (2213 UI/ml). Tali risultati ci hanno orientato verso una potenziale parassitosi. La ricerca dei parassiti fecali e delle loro uova, su 3 campioni, ha confermato il sospetto diagnostico, segnalando la presenza di *Blastocystis hominis*. La presenza nei campioni fecali di tale parassita intestinale, era stata, come spesso risulta, asintomatica anche nella nostra paziente. Peraltro, sulla base delle continue recidive di angioedema e di alcune segnalazioni in letteratura che le associano anche con la parassitosi intestinale da *Blastocystis hominis*, è stato effettuato un approccio terapeutico ex-juvantibus con Cotrimossazolo (160-800 mg bid per 6 giorni). Dopo un mese, però, non si sono registrate significative variazioni cliniche e la ricerca del parassita fecale risultava nuovamente positiva. Su suggerimento di un collega infettivologo, pur con il dubbio di trattare in modo forse eccessivo ed ostinato un'infezione a dubbio potere patogeno, abbiamo consigliato alla paziente l'assunzione di Paromomicina (40 mg/kg/die, suddivisi in 3 somministrazioni, per 4 giorni). Attualmente, a distanza di 15 settimane dalla terapia con l'antibiotico aminoglicosidico e con l'esame coproparassitologico negativo, la paziente non ha più lamentato episodi di angioedema.

Conclusioni. Nonostante la ricerca delle cause di orticaria o angioedema cronico sia spesso infruttuosa, difficile e dispendiosa, il raggiungimento dell'identificazione del meccanismo eziopatologico deve rimanere, in ogni caso, il target diagnostico perché l'unico in grado di fornire rapidi e brillanti successi terapeutici.

IL LIVELLO DELLE IgE SPECIFICHE PER Bet v 1 E Bet v 2 NON E' UTILE PER PREDIRE LA PRESENZA DI SINDROME ORALE ALLERGICA

B-28

D.Villalta, M. Da Re, S. Stella, P. Martelli

Allergologia e Immunologia clinica–DML, A.O. “S. Maria degli Angeli”, Pordenone

Scopo del lavoro. L'allergia alle Betulaceae in circa un terzo dei casi si associa a sindrome orale allergica (SOA), in particolare in seguito ad assunzione di frutta della famiglia delle Rosaceae. Ciò è dovuto alla presenza in tali alimenti di proteine omologhe a Bet v 1 (PR-10), l'allergene principale del polline di Betulla, o di Bet v 2, molecola appartenente alla famiglia delle profiline, proteine ampiamente diffuse nel mondo vegetale. Dal momento che solo una parte dei soggetti che presentano IgE specifiche per Bet v 1 e Bet v 2 hanno SOA, si è voluto valutare se il livello autoanticorpale può discriminare tra soggetti con e senza SOA.

Materiale e metodi. Per lo studio sono stati selezionati 22 pazienti consecutivi con allergia alle Betulaceae non affetti da SOA e 31 affetti da SOA. Questi ultimi sono stati suddivisi in ulteriori sottogruppi: a) gruppo 1, pazienti con SOA da frutta della famiglia delle Rosaceae; b) gruppo 2, pazienti con SOA da Rosaceae + altra frutta; c) gruppo 3, pazienti con SOA da Rosaceae + altra frutta + verdura. In tutti i soggetti è stato eseguito il dosaggio delle IgE specifiche per Bet v 1 e Bet v 2 con il metodo ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Svezia).

Risultati. Il valore medio delle IgE per Bet v 1 nei soggetti senza SOA è risultato 14.1 ± 10.4 kU/L (range 1.1 - 34.3) e nei soggetti con SOA 13.9 ± 12.3 kU/L (range 1.3 - 44.6) (P = n.s.). Non significativamente diversi, tramite test di Kruskal-Wallis, sono risultati i valori nell'ambito dei diversi gruppi di pazienti con SOA. Anche il valore delle IgE specifiche per Bet v 2 non è risultato significativamente diverso tra il gruppo di pazienti senza SOA (0.6 ± 1.7 kU/L; range: 0 - 8) e quello dei pazienti con SOA (2.4 ± 5.2 kU/L; range 0 - 11.6), come pure tra i vari gruppi con SOA (P=0.09). La percentuale dei soggetti con positività per Bet v 2, comunque, è risultata diversa nei vari gruppi studiati: 5/22 (22%) nei pazienti senza SOA; 0/7 (0%) nei pazienti con SOA del gruppo 1; 6/12 (50%) in quelli del gruppo 2; 6/12 (50%) in quelli del gruppo 3.

Discussione e conclusioni. Dai risultati di questo studio la determinazione del livello delle IgE specifiche per Bet v 1 e Bet v 2 non sembra essere utile per discriminare i pazienti con allergia a Betulaceae senza SOA da quelli con SOA. La positività IgE per Bet v 2 sembra, invece, maggiormente associarsi a SOA da ingestione di verdura o frutta appartenenti a famiglie diverse dalle Rosaceae e quindi essere predittiva di SOA estesa ad una più ampia gamma di alimenti di origine vegetale.

VALUTAZIONE DEL POTERE ALLERGIZZANTE DELLA FLORA NEL BACINO DEL LAGO DI GARDA

B-29

A. Melchiorre¹, M.C. Marcotulli¹, F. Farisè¹, B. Milanese²

¹Divisione di Pneumologia, A.O. di Desenzano., ²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. di Desenzano d/G

Scopo del lavoro: si è voluto verificare il potere allergizzante della flora presente nel bacino del lago di Garda e valutare le possibili alternative da utilizzare nelle diverse aree verdi comuni.

Materiali e metodi: a tal fine si è utilizzato un rilevatore pollinico VPPS Lanzoni situato sul tetto dell'Azienda Ospedaliera di Desenzano.

Risultati: Desenzano gode di un clima temperato con una temperatura media annua di 13,6° che consente lo sviluppo di una rigogliosa flora mediterranea. È un territorio che comprende una vasta area montuosa all'interno, ed a sud, una collinare formata dai rilievi morenici del lago di Garda. La ricchezza floristica maggiore è senz'altro espressa dalla zona montana, con le Fagacee, Corilacee, Betulacee. Nella zona collinare stazionano Querce e Frassino. Nella ricca ed estesa campagna sono comuni le specie arboree del genere Cupressus, Pinus, Thuja, Ligustrum. La famiglia delle oleacee è rappresentata nella flora autoctona bresciana da 3 soli generi: Fraxinus, Phyllirea e Ligustrum, ma si incontrano frequentemente coltivati l'olivo (Olea europaea) e la notissima forsizia. La flora bresciana conta due generi di Urticacee: urtica e parietaria. Il genere Parietaria ha grande rilevanza allergenica, mentre il genere Urtica è di scarsa importanza allergologica. L'Assenzio selvatico (artemisia vulgaris) è comune in tutto il bresciano, dalla pianura alla fascia collinare, più raro in quella montana fino a 100 metri. L'Ambrosia da noi è principalmente diffusa in pianura e lungo il medio corso del fiume Oglio e Chiese, affluenti del Po, fino a 300 metri di altitudine. L'aumento dell'allergia al cipresso da noi registrato negli ultimi anni, è imputabile oltre che all'elevato numero di questi alberi nelle rotatorie che stanno sostituendo i semafori, anche alla importazione di specie diverse che producono un epitopo allergenico che il sistema immunitario ha difficoltà a riconoscere. Le concentrazioni di polline di Olivo nell'atmosfera in presenza di idonee condizioni climatiche toccano valori molto elevati nel momento di massima fioritura. Nella zona del Garda si sono sfiorati negli anni precedenti punte di 1550 granuli per metro cubo d'aria. E' da sottolineare che nel Maggio 1999 in uno "Studio prospettico della pollinosi da Ambrosia in soggetti con sospetta allergia respiratoria" a fronte di 91 pazienti allergici all'ambrosia su 1040 intervistati a Busto Arsizio, 0 positività su 547 pazienti furono rilevate a Desenzano.

Conclusione: Per tutto quanto fin qui detto, sarebbe opportuno considerare piante ed erbe alternative per l'arredo verde urbano e la bonifica di piante infestanti allergeniche già in atto in alcuni comuni.

LA DIAGNOSI “IN VIVO” ED “IN VITRO” DELL’ORTICARIA CRONICA AUTOIMMUNE. CONFRONTO TRA I DUE APPROCCI DIAGNOSTICI

B-30

I. Brusca, M. Barrale, V. Cantisano, V. Vitale, S.M. La Chiusa

Ospedale Buccheri La Ferla F.B.F. Palermo

Scopo dello studio: l’orticaria autoimmune è la forma più frequente, tra quelle identificate, dell’orticaria cronica, (OC), ed è dovuta ad anticorpi diretti contro il recettore ad alta affinità delle IgE o contro le stesse IgE. Usualmente la diagnosi è effettuata “in vivo” tramite introdermoreazione con siero autologo, (IDSA). E’ stato descritto, ma non è ancora di uso comune, un test “in vitro”, in citofluorimetria, basato sulla degranolazione di basofili di donatore sano incubati con siero del paziente (FCBD). Lo scopo dello studio è verificare gli aspetti metodologici ed i risultati del FCBD rispetto all’IDSA.

Metodi: sono stati arruolati e sottoposti ad IDSA ed FCBD 67 pazienti consecutivi affetti da sindrome orticaria-angioedema, di questi 51 erano da OC, (gruppo A), 10 da allergia alimentare, (FA, gruppo B) e 8 da allergia a farmaci (DA, gruppo C). In 15/51 affetti da OC è stata identificata la causa, 36 sono stati classificati inizialmente idiopatici. I sieri dei pazienti sono stati divisi in due aliquote, una di queste è stata incubata a 57° per 30’. I test sono stati effettuati con entrambe le aliquote, la degranolazione dei basofili saggiata con il kit FLOW CAST (Bühlmann).

Risultati: 22/36 pazienti del gruppo A idiopatici sono risultati positivi all’ IDSA, senza alcuna differenza tra le aliquote, 2/10 nel gruppo B, 1/8 nel gruppo C, (sensibilità 61.1%, 95% C.I 57.4-75.9, specificità 91.6%, 95% C.I 86.3-97.1). Complessivamente 22/36 pazienti del gruppo A idiopatici sono risultati positivi all’ FCBD ma con differenze tra le aliquote, 2/22 erano positivi solamente nell’ aliquota non trattata e 2/22 in quella inattivata a caldo. 1/2 pazienti positivi nella sola l’ aliquota non riscaldata, non rispondendo ai protocolli classici, è stato trattato con ciclosporina con ottima risposta alla terapia. Nessuno dei gruppi B e C è risultato positivo (sensibilità complessiva 61.1%, 95% C.I 57.4-75.9, specificità 100%). L’ analisi delle curve ROC ha evidenziato un AUC di 0.937 ed un cut-off pari ad 1.6 volte il livello basale di attivazione dei basofili del donatore, similmente a quanto riportato in letteratura. Nel confronto tra FCBD ed IDSA i risultati erano discordanti in 4 pazienti, con una concordanza di K=0.888 (95% C.I 0.78-0.94).

Conclusioni: su pazienti consecutivi l’FCBD ha mostrato una ottima concordanza con l’IDSA, una equivalente sensibilità e una maggiore specificità, quest’ ultima da verificare nel tempo e su una popolazione più ampia. Le discordanze, determinate dal diverso trattamento delle aliquote, suggeriscono una eterogeneità dei fattori sierici responsabili della sintomatologia nei pazienti affetti da OC autoimmune.

DOSAGGIO DELLE IgE SPECIFICHE VERSO ALIMENTI IN UNA POPOLAZIONE DI PAZIENTI IN ETÀ PEDIATRICA

B-31

P. Prandini, S. Cocchi¹, B. Milanesi¹

U.O. Medicina Trasfusionale e Allergologia Ospedale di Gavardo, ¹Laboratori di Patologia Clinica A.O. Desenzano del Garda (BS)

Scopo del lavoro: valutazione dei risultati del dosaggio delle IgE specifiche verso alimenti in bambini con sospetto di allergia alimentare.

Materiali e metodi: sono stati studiati pazienti in età pediatrica che avevano eseguito negli ultimi 6 mesi la determinazione delle IgE specifiche verso comuni allergeni alimentari. Gli alimenti considerati sono stati: latte, α -lattalbumina, β -lattoglobulina, caseina, uovo (albume e tuorlo), merluzzo, grano, arachide, soia, nocciola, noce, pomodoro. La determinazione è stata eseguita mediante strumento ImmunoCap 250 della ditta Phadia. I risultati sono espressi in kUA/l e suddivisi in classi di positività: classe 0 (<0,10 kUA/l), classe dubbia (0,10-0,35), classe I (0,35-0,70), classe II (0,70-3,50), classe III (3,50-17,50), classe IV-V (17,50-100), classe VI (>100). La significatività della presenza di IgE specifiche per ogni singolo allergene alimentare è stata determinata con lo “Specificity decision point” di Sampson che identifica i seguenti valori di soglia clinica in kUA/l: per l’ uovo 7, per il latte 15, per il grano 26, per il pesce 3, per l’arachide 14, per la soia 30.

Risultati: abbiamo valutato 120 pazienti (64 maschi e 56 femmine, età media 4,9 anni, range 6 mesi - 12 anni). 68 pazienti (57%) sono risultati positivi al test e 52 (43%) negativi. Tra le positività riscontrate 94 erano interpretate come dubbie, 31 di classe I, 32 di classe II, 23 di classe III, 5 di classe IV-V, 4 di classe 6. Gli alimenti più indagati erano classicamente il latte (in 110 bambini), l’uovo (106), il pomodoro (83), il grano (77). Sono stati riscontrati valori di IgE oltre la soglia clinica di Sampson (sicuramente significativi) in: 4 bambini per l’ uovo (albume) (rispettivamente 32,10 kUA/l, 32,80 kUA/l, 33,80 kUA/l e >100 kUA/l); 1 bambino per il latte (>100 kUA/l); 2 bambini per il grano (34,2 e >100 kUA/l); 1 bambino per il pesce (7,17 kUA/l).

Discussione e conclusioni: più della metà dei bambini testati erano positivi a qualche alimento e ciò suggerisce una discreta appropriatezza nella richiesta della indagine analitica. Test allergometrico positivo comunque non significa sempre allergia; in particolare valori di IgE specifiche superiori alla soglia clinica, quindi sicuramente significativi, sono stati trovati in un piccolo numero di bambini (8); per le positività di grado inferiore rimangono determinanti la correlazione con la sintomatologia clinica e le metodiche diagnostiche in vivo (prick test con alimenti freschi, diete di eliminazione e prove di scatenamento).

INTEGRAZIONE DIAGNOSTICA STRUMENTALE, DI DUE DIFFERENTI METODICHE, NELLA DIAGNOSTICA ALLERGOLOGICA IN VITRO

B-32

A.T. Scacchetti, S. Cecoli¹, M. Setti¹, C. Canali, P. Paolini, T. Trenti

Dipartimento di Patologia Clinica Ausl di Modena, Nuovo Ospedale S. Agostino Estense

¹Servizio di Ingegneria Clinica – Ausl di Modena

Premessa: Temi quali riorganizzazione delle attività, economie di scala e ottimizzazione dei flussi sono ormai obiettivi nei quali le organizzazioni sanitarie si devono confrontare, garantendo il massimo della qualità dei servizi erogati. I Dip.di Patologia Clinica si vedono dunque impegnati ad approntare nuovi modelli clinico-gestionali ed interagire attivamente con i Serv.di Ingegneria Clinica. Attraverso tali collaborazioni si può essere attivi nei confronti delle evoluzioni tecnologiche, sempre più sofisticate, garantendo la conformità alla normativa vigente sui diagnostici in vitro.

Scopo del Lavoro: Una singolare esperienza è stata condotta nel lab.TDA (NOSAE, Az.Ausl- MO) per la Diag. Allergologica, in sinergia con il Serv. di Ingegneria Clinica. Nell'ultimo semestre 2008 è avvenuta una centralizzazione dell'attività di cui sopra, su base provinciale. Ciò, ha comportato una serie di problemi, non ultimo, la ferma volontà di esaurire tutte le scorte provenienti da entrambe le Az.Sanitarie, curando l'appropriatezza delle richieste. Si rendeva necessaria un'organizzazione delle scelte metodologiche basate sulla conoscenza delle performance strumentali ed analitiche delle due ditte fornitrici (Phadia, Immucap 250; Siemens, Immulite 2000) e una integrazione software gestionale capace di afferire allo stesso paziente.

Il "Phadiatop Infant" (Phadia) rappresenta una soluzione ai quesiti di base che si presentano privi di dati anamnestici rilevanti. L'obiettivo è stato quello di selezionare i pz risultati positivi al test di screening ed analizzarli con i singoli allergeni della ditta Siemens, solo dopo un trial di conferma/identificazione con allergeni Phadia.

Materiali e Metodi: Sono stati selezionati 54 pz risultati positivi al "Ph.Infant" (28 maschi, 26 femmine; 9 mesi-4 anni) i cui sintomi erano: wheezing, malassorbimento, dermatite, stipsi/diarrea. A tali pz, è stato applicato un pannello di allergeni concordato con i clinici del territorio e sulla base della storia clinica individuale.

Risultati e Conclusioni: I due metodi, hanno confermato la positività del test con la presenza di due/più allergeni. Negli specifici allergeni, abbiamo trovato alcune incongruenze dovute alla diversa natura dell'estratto allergenico. Le maggiori discrepanze, con range di concentrazione 0.10-0.59 kUA/l, sono state riscontrate per f4 (35%), f14(22%), f2(15%), g2(13%). Un paziente, con dermatite atopica e rinite stagionale, presentava discordanze per f4, f14, f25, f85 con concentrazioni >1,04 kUA/l (rilevazione Phadia). Cross-reattività dovuta a presenza di g2,g8>50 kUA/l. Dopo questa prima fase, l'integrazione dei metodi si è svolta alla luce delle criticità sopra esposte.

PRESENTAZIONE DI UNA NUOVA SCHEDA ANAMNESTICA, MIRATA ALL'APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA ALLERGOLOGICA, NELLA SOCIETÀ MULTIETNICA DEL NOSTRO PAESE

B-33

A.T. Scacchetti, F. Alessi¹, A.M. Cenci, C. Canali, T. Trenti

Dipartimento di Patologia Clinica Ausl di Modena, ¹Servizio di Mediazione Linguistica e Culturale

Nuovo Ospedale S. Agostino Estense

Premessa: L'era di transizione basata sull'uso degli estratti allergenici verso allergeni ricombinanti per la definizione dello specifico profilo allergenico (CRD), rappresenta un periodo del tutto rivoluzionario per la diagn. allergologica. Purtroppo, prescrizioni con la dicitura "RAST COMPLETO" senza alcun quesito diagnostico, fanno ancora capolino nel tripudio di questo fermento culturale.

Scopo del lavoro: Se è ben noto come la diagnosi di allergia debba avvalersi di appropriate informazioni clinico/anamnestiche per una corretta diagnosi di laboratorio, tuttavia nella pratica quotidiana le richieste senza motivazioni adeguate per i test allergologici in vitro sono in continuo aumento. Al fine di migliorare questa situazione, il lab.TDA (NOSAE –Az.Ausl,MO) ha introdotto una nuova scheda anamnestica/filtro presso i 38 Centri Prelievi della provincia, richiedendo la presenza di alcuni indicatori. Verosimilmente il 10% di anamnesi non evase era dovuto alla presenza di barriera linguistica. A tale scopo, grazie al Serv. di Mediazione Linguistica e Culturale dell'Azienda, sono state tradotte le informazioni richieste al paziente in lingua inglese, francese, spagnolo, arabo e cinese. I pz che non parlano la lingua di chi eroga le cure spesso ricevono un'assistenza sanitaria che risente di questa difficoltà, con rischio di minore efficacia/efficienza.

Materiali e metodi: Il lab TDA con l'obiettivo di introdurre un nuovo approccio per la promozione dell'appropriatezza, ha svolto una analisi dettagliata relativa al periodo (2004-2008), prendendo come indicatori:

- Numero delle richieste per la ricerca delle IgE specifiche negli ultimi 4 anni, (incremento percentuale del 12,5%)
- Numero degli allergeni saggiati (incremento del 9%)
- Numero delle richieste: mirate specialistiche, non mirate specialistiche, generiche, provenienti dal MMG/PDLS; (diminuzione del 20% delle richieste mirate specialistiche a favore delle richieste provenienti dai MMG/PDLS)
- % di positività degli allergeni/ pazienti.(70% di risultati significativi)
- % di anamnesi che non soddisfano le notizie richieste (16%)

Azione correttiva: Introduzione di Scheda Anamnestica tradotta in varie lingue come strumento di comprensione verso etnie in costante evoluzione

Risultati e Conclusioni: Da una prima analisi, dopo l'introduzione della scheda in lingua francese, inglese e spagnolo, la percentuale delle richieste non evase per difficoltà linguistiche si è ridotta del 5%. E' auspicabile che le imminenti traduzioni in lingua araba e cinese, possano contribuire, nella prossima elaborazione semestrale, ad una significativa riduzione degli indicatori citati.

MANAGEMENT LABORATORISTICO DEL PAZIENTE PEDIATRICO**B-34****C. Canali, A.T. Scacchetti, T. Trenti**

Dipartimento di Patologia Clinica – Ausl di Modena, Nuovo Ospedale S. Agostino Estense

Premessa: la diagnosi di patologie IgE mediate costituisce un prerequisito per la prevenzione secondaria nei bambini allergici. La diagnosi di allergia, si costruisce step by step sulla base di una anamnesi/storia clinica del paziente, esame obiettivo, richiesta appropriata dei test diagnostici. Anche all'interno dei test diagnostici è possibile costruire un percorso per la gestione efficace del paziente pediatrico, soprattutto quando anamnesi/storia clinica risultano carenti.

Scopo del lavoro: l'obiettivo del lavoro è valutare i risultati ottenuti dai test di screening e confrontarlo con gli allergeni testati sui pazienti positivi al test di primo livello.

Materiali e metodi: è stato svolto uno studio osservazionale su una popolazione costituita da 1428 bambini (età: 0-4 anni) in un periodo di 3 anni (2006-2008) afferenti al Laboratorio di Diagnostica Allergologica in vitro della provincia di Modena. I pazienti presentavano i seguenti sintomi: wheezing, malassorbimento, dermatite, stipsi/diarrea. È stato eseguito il test di screening e sui positivi, un pannello di 18 allergeni: F1 (albume), F2 (latte), F3 (pesce), F4 (grano), F13 (arachidi), F25 (pomodoro), F14 (soia), F49 (mela), F85 (sedano), G2/G8 (graminacee), D1/D2 (acari), E1 (forf. gatto), E5 (forf. cane), M6 (*Alternaria alternata*), W21 (*Parietaria judaica*), T3 (betulla). Gli allergeni e il test di screening (Phadiatop Infant) utilizzati sono della ditta Phadia (Uppsala-Svezia).

Risultati e Conclusioni: Su 1428 bambini, 515 (36%) sono risultati positivi allo screening. Il pannello di allergeni testato mostra le seguenti percentuali di sensibilizzazione: F1 (61.8%), F2 (69.9%), F3 (5.3%), F4 (46.6%), F13 (14.3%), F25 (19.7%), F14 (15.2%), F49 (9%), F85 (11.6%), G2 (21.9%), G8 (30%), D1 (21.9%), D2 (18.3%), E1 (12.5%), E5 (10.7%), M6 (16.5%), W21 (5%), T3 (9%). La ricerca ha confermato che i maggiori allergeni sensibilizzanti, nel primo anno di vita, sono F1, F2 ed F4; in questa fascia di età 7 bambini mostravano una polisensibilizzazione verso tutti i 18 allergeni. Nei pazienti con età compresa nei 15 mesi abbiamo trovato una considerevole sensibilizzazione agli acari (17%) e alla forfora di animali (12%) con concentrazioni >5.5kUA/l, quando dati riportati in letteratura mostrano una sensibilizzazione verso questi gli allergeni in età >2/3 anni. Inoltre, possiamo affermare che è possibile testare solo G8 senza G2 e D1 senza D2. G8 e D1 presentano potenti proprietà allergizzanti non sempre presenti in G2 e D2. In questo modo è possibile ottimizzare il siero dei pazienti e testare 2 allergeni invece di 4. Infine, suggeriamo l'applicazione dei due seguenti pannelli in funzione dell'età del paziente: entro il primo anno di età: F1, F2, F4, D1, E1, E5; dopo il 12° mese di vita: F1, F2, F3, F4, F13, F25, F14, F85, G8, D1, E1, E5, M6.

IL TEST DI ATTIVAZIONE DEI BASOFILI NELLA DIAGNOSI IN VITRO DELLA IPERSENSIBILITÀ ALIMENTARE**B-35****I. Brusca, A. Carroccio, P. Mansueto, M.L. Lo Spalluti, G. Pirrone, M. Barrale, V. Cantisano, S.M. La Chiusa, G. Iacono**

Ospedale Buccheri La Ferla, Università degli Studi di Palermo, Ospedale dei Bambini G. Di Cristina Palermo

Scopo dello studio: in una parte dei pazienti con diagnosi clinica di colon irritabile (IBS), è evidenziabile una stretta relazione tra i sintomi clinici ed alimentazione. In alcuni di questi casi la sensibilizzazione ad antigeni alimentari (FH), è confermata dal challenge in doppio cieco con placebo (DBPC), e dal miglioramento clinico dopo dieta di eliminazione. Ad oggi, il dosaggio di IgE ed gli Skin Prick Test, usualmente utilizzati, non forniscono soddisfacente accuratezza diagnostica. Promettenti sembrano, invece, i test di scatenamento in vitro, che tramite marcatori di membrana dei basofili, quali il CD63 od il CD203c, rivelano l'avvenuta degranolazione delle cellule dopo incubazione con l'antigene (FC). Lo scopo dello studio è quello di valutare sensibilità, specificità ed accuratezza diagnostica di questo metodo, utilizzando un kit disponibile commercialmente con il CD63 come marker di attivazione, applicato alla diagnosi di ipersensibilità alimentare con sintomatologia atipica.

Metodi: 120 pazienti consecutivi, (85 F, 35 M, range 17-61a, mediana 46), con una diagnosi di colon irritabile definiti secondo i criteri di Roma III, sono stati sottoposti ad esami di routine, H2-breath test, sierologia per celiachia, IgE totali e specifiche ed FC, (Flow Cast, Bühlmann), per alimenti. I pazienti quindi sono stati sottoposti a DBPC ed a dieta di eliminazione come gold standard per la diagnosi. Durante lo studio la valutazione sintomatologica è stata effettuata tramite score.

Risultati: 24 pazienti, (20%), soffrivano di FH con sintomi che significativamente miglioravano dopo dieta di eliminazione. Frequente l'osservazione in questi pazienti di una lunga storia clinica e di aver sofferto di allergia alimentare in età pediatrica. L'FC, nella diagnosi di FH, mostrava una sensibilità dell'86% una specificità dell'88% con accuratezza diagnostica dell'87%. Valori significativamente maggiori rispetto ad IgE totali e specifiche, ($p < 0,001$).

Conclusioni: la valutazione citofluorimetrica del CD63 espresso sulla membrana dei basofili dopo incubazione con antigeni alimentari mostra una buona sensibilità, specificità ed accuratezza diagnostica. Questi dati dimostrano l'utilità di questo metodo nell'identificare un subset di pazienti con sintomatologia da colon irritabile e FH.

IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO ALLERGENE DI 20 kDa RESPONSABILE DELL'ALLERGIA AI CROSTACEI E DELLA CROSS-REATTIVITA' CON GLIACARI

B-36

D. Villalta¹, E. Tonutti², D. Visentini², N. Bizzaro³, D. Roncarolo⁴, S. Amato⁴, G. Mistrello⁴

¹Allergologia e Immunologia clinica - DML, A.O. "S. Maria degli Angeli", Pordenone; ²Immunopatologia e Allergologia - DML, AOU, Udine; ³Patologia clinica, Ospedale civile, Tolmezzo (UD); ⁴Lofarma S.p.A, Milano

Scopo del lavoro. L'allergia ai crostacei è una delle più comuni allergie alimentari e la tropomiosina, una molecola di 35-38 kDa altamente conservata e stabile al calore, è da tempo identificata come l'allergene principale, responsabile anche della cross-reattività con gli acari. Non tutti i pazienti affetti da tale allergia, comunque, sono positivi alla tropomiosina. Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare se tali soggetti presentano IgE rivolte verso una o più molecole diverse dalla tropomiosina.

Materiali e metodi. Tre diversi pool di sieri sono stati sottoposti ad immunoblotting (IB), preparato a partire da un estratto di crostacei (*Paeneus monodon*): il primo (pool 1) proveniente da 5 pazienti con allergia a crostacei e ad acari, ma negativi per IgE verso la tropomiosina (rPen a1, ImmunoCap- Phadia; nPen m1, Immulite 2000- Siemens); il secondo (pool 2) da 5 pazienti con allergia a crostacei e acari positivi per IgE verso la tropomiosina; il terzo (pool 3) da 5 soggetti con sola positività ad acari. Una frazione dell'estratto di crostacei arricchita nella componente proteica di 20 kDa è stata usata alle concentrazioni di 10 e 100 µg/mL per pre-adsorbire il pool 1 e valutare, tramite test ELISA, il livello di inibizione del legame sia in pozzetti con adeso l'estratto di crostacei, che in pozzetti con adeso l'estratto di acari.

Risultati. L'IB del pool 2 ha evidenziato una reattività IgE verso una componente di 38 kDa, corrispondente alla tropomiosina, mentre l'IB del pool 1 ha evidenziato una reattività IgE verso una componente proteica di 20 kDa, non presente nell'IB dei pool 2 e 3. Il pre-adsorbimento del pool 1 con l'estratto arricchito della componente proteica di 20 kDa provocò una diminuzione del legame ai pozzetti con legato l'estratto di crostacei del 56% (alla concentrazione di 100 µg/mL) e in quelli con l'estratto di acari del 14 e 35% (rispettivamente alle concentrazioni di 10 e 100 µg/mL).

Discussione e conclusioni. In questo studio abbiamo identificato un nuovo allergene di 20 kDa responsabile dell'allergia ai crostacei e della cross-reattività tra crostacei ed acari, come evidenziato dalla risposta dose dipendente del test di inibizione. Dal momento che alcuni pazienti con allergia ai crostacei presentano la positività solo a tale allergene è importante che esso, dopo che sarà ben caratterizzato, venga introdotto nei sistemi diagnostici che si basano sulla Component-resolved diagnosis, al fine di evitare false negatività diagnostiche.

INTRODUZIONE DI NUOVI PARAMETRI NELL'ORGANIZZAZIONE DI PERCORSI DIAGNOSTICI IN EMATOLOGIA: L'ESPERIENZA IN UN LABORATORIO AD ALTA AUTOMAZIONE

C-01

S. Tagliavini, A.M. Scognamiglio, T. Trenti, A.M. Cenci

Dip.Pat.Clin. Corelab NOCSAE-AUSL Modena

Introduzione: Il laboratorio BLU esegue circa 8.500.000 test/anno, 12% immunometrici su strumenti Abbott e Beckman Coulter connessi ad automazione Power Processor. I test post-base nel percorso diagnostico "anemia", dopo valutazione in primis per Hb ed MCV (da circa 1850 emocromi/die eseguiti su HT1500 Beckman Coulter), venivano in precedenza così eseguiti: FER Architect e VB12 e FOL AxSYM (Abbott), EPO in altra struttura, sTfR R&D Systems Quantikine.

Scopo del lavoro: consolidamento dei test di diagnosi/conferma anemia su UniCelDxI800 dopo valutazioni analitico-cliniche per realizzare un assetto organizzativo "fully automated".

Materiali e metodi: Campioni della routine: interni da 4 ospedali ed esterni da tutta la provincia. Determinazioni eseguite da 108 a 340 a seconda del test: conferma o creazione Intervalli di Riferimento, (IR). Valutazioni di performance analitica con metodiche: DxI800 (CLIA) vs FER (CMIA), VB12 e FOL (MEIA); EPO DXI (A-EPO) vs Immulite 2000 (CLIA, I-EPO); sTfR DXI vs manuale; confronto metodi con Software MedCalc (Passing&Bablok PB, Bland&Altman, Mountain plot). Saggio della rilevanza clinica in popolazioni omogenee (oncologici, renali, atleti testati pre o post sforzo).

Risultati: Si riportano i dati per gli analiti innovativi EPO e sTfR. EPO: sensibilità analitica = 0.067 mIU/mL media+2SD (95°); imprecisione analitica media (11 giorni 2 replicati su 3 livelli L BioRadSpecialty) I-EPO/A-EPO: L1=10.33/11.93, CV% 6.31/4.7; L2=35.39/41.75, CV% 2.24/3.26; L3=69.3/81.96, CV% 5.48/4.61; PB (n=253): y = -0.2151 + 0.8836x. IR pediatrici: M (42) 1.56-38.36 mIU/mL, F (28) 3.24-39.39 mIU/mL; IR adulti: M (26 di 19-50 anni) 3.86-13.67 mIU/mL, (42 di 51-89 anni) 2.19-22.59 mIU/mL, F (41 di 26-50 anni) 4.05-37.75 mIU/mL, (61 di 51-85 anni) 4.91-29.76 mIU/mL. sTfR: i risultati, valutati per alcuni dei gruppi omogenei, ricalcano la letteratura (PB (n=108) Y=1.79+0.87x, r=0.96).

Discussione e conclusioni: I dosaggi CLIA Access® risultano ripetibili e accurati, garantendo affidabilità nella risposta a specifici quesiti clinici. Il nuovo CLIA sTfR costituisce prezioso indicatore della carenza di ferro per differenziare l'anemia da patologie croniche da quella carenziale. In campo ematologico DxI800 si propone come sistema moderno e valido nel percorso diagnostico. I TAT globali forniti (8h interni, 24h esterni), coniugati ad un corretto rapporto nel sistema di dialettica interdisciplinare, contribuiscono alla gestione sollecita e accurata del paziente in ambito clinico, decisionale e terapeutico. L'introduzione di questi nuovi test contribuisce a fornire un servizio di buona qualità sia in realtà piccole o specialistiche che in grandi consolidamenti strutturali, in situazioni anche di allarme clinico.

AUTOMAZIONE E CITOLOGIA LIQUORALE**C-02****L. Giampaolo, D. Carra, R. Corradini, S. Fregni, R. Gargiulo, P. Natali, M. Sarti, A.M. Cenci**

Dip.Pat.Clin. Corelab NOCSAE-AUSL Modena

Introduzione: Le cellule nel Liquido Cefalo Rachidiano (LCR) si studiano ancora al microscopio (M.O.) con imprecisione e poca standardizzazione. Basse concentrazioni, atipie cellulari e campioni scarsi limitano l'utilizzo in questo campo dell'automazione che esperienze oggi numerose e pubblicate invece ripropongono.

Scopo del lavoro: Confronto performance M.O. vs varie automazioni.

Materiali e metodi: 96 campioni di LCR da puntura lombare in pazienti di UUOO ricoverati (maggio-luglio 2009) per patologie varie (infettive, degenerative, neoplasie primitive e secondarie, traumi) per lo più del Dipartimento di Neuroscienze; esame M.O. secondo protocollo in vigore (conta in camera Nageotte, colorazione tipo Wright, morfologia su citospin). Range elementi: da 2 a >3.500/μL. Strumenti utilizzati: Coulter LH750 IL (principio Coulter, tecnologia VCS, software approvato FDA per Liquidi Biologici); Sysmex XE-2100 (conta e definizione nei canali WBC-Baso e WBC-Diff, laser e fluorescenza con software per liquidi biologici); IRIS iQ200 IL (microscopia computerizzata, foto digitalizzata, elaborazione software, classificazione immagini con rete neurale specializzata (dimensione, forma, contrasto, contenuto interno), visualizzate in categorie, revisione video per cellule non classificabili). Si sono usati 1 o più strumenti secondo la quantità di campione (2 per 35 e 3 per 18 LCR). In 13, insufficienti per test in toto su IRIS, si sono allestite diluizioni (max 1:10) valutando il permanere della corrispondenza con M.O. e l'uso di questa modalità nel riconoscere ed archiviare immagini anche con elementi scarsi. L'imprecisione a bassi livelli è stata vista in 4 LCR usati diverse determinazioni e diluizioni.

Risultati: Coulter LH750 conferma (studio 2006) risultati migliori a concentrazioni intermedie (50-200 cell/μL, 48 LCR); modica sovrastima (in media <8%) in 38 campioni ad alto numero forse per minor precisione al M.O. vs automazione quanto più ci si avvicina a conteggi simili a quelli circolanti. Anche per XE 2100, come già pubblicato, performance migliore e nessun falso negativo a valori medio alti e suggerimenti da immagini e flag strumentali per la citologia. Per IRIS buona confrontabilità con M.O. e altri strumenti per tutti i valori e nelle prove di simulazione anche a pochi elementi; apprezzabile il vantaggio dell'archivio con elementi ripresi allo stato nativo.

Discussione e conclusioni: Affiancando il M.O. l'automazione assicura accuratezza, precisione e indicazioni sulle cellule. Quando possibile, l'archiviazione delle immagini, è valore aggiunto per tracciabilità, e ausilio clinico in follow up e per i casi che riproducono morfologie liquorali simili alla periferia. La quantità di campione necessaria per l'esame può costituire un limite risolvibile con la diluizione.

IL GESTIONALE DEL SETTORE DI EMATOLOGIA: SUPPORTO E OPPORTUNITA'**C-03****M. Moretti, E. Delprete**

S.C. Patologia Clinica Ospedale S.Croce Fano (PU) Zona Territoriale 3 ASUR Marche

Scopo del lavoro: Da due anni il settore di ematologia è dotato di un gestionale che ne ha migliorato l'efficienza. Si è pensato di arricchirne le funzioni realizzando i seguenti obiettivi: 1) teleassistenza sui tre presidi della ZT3, 2) trasferimento dell'output strumentale (dati e immagini) fra i tre laboratori per neutralizzare la sede di validazione del dato analitico, 3) segnalazione, tracciabilità e gestione dei valori critici, 4) validazione parziale con possibilità di libera scelta dei parametri refertabili e blocco di quelli da sottoporre a revisione, 5) generazione di profili analitici specifici per tipologia di pazienti, 6) classificazione e archiviazione dei pazienti per patologia con possibilità di integrare con immagini digitali e note descrittive il campione, 7) elaborazione statistica dei dati raccolti con criteri di ricerca personalizzabili.

Materiali e Metodi: DMS® (Dasit Management System) è un middleware che permette di gestire attraverso regole logiche la validazione clinica dell'output strumentale e garantire la tracciabilità del campione. Lo sviluppo delle applicazioni aggiuntive ha richiesto una pianificazione del processo coinvolgendo il personale del laboratorio, del centro elaborazioni dati aziendale e del fornitore (sistemisti ed applicativi). Del DMS® si sono realizzati diversi aggiornamenti software, contestualmente si sono resi necessari interventi hardware e software per il cablaggio della rete intra e internet per un'efficace trasmissione dei dati. Complessivamente lo sviluppo ha richiesto sei mesi.

Risultati: I dati raccolti nei sei mesi successivi all'implementazione ci indicano: 1) attivazione di 5 teleassistenze con risoluzione della problematica; 2) tele validazione di intere (12) o parti della seduta analitica; 3) gestione di 145 valori critici; 4) validazione parziale di 321 campioni; 5) generazione di profili specifici per 3 reparti; 6) classificazione e archiviazione di 489 pazienti; 7) diverse revisioni statistiche per controllo e aggiornamento del sistema.

Discussione e Conclusioni: Le nuove opportunità informatiche ci permettono: un controllo in tempo reale del funzionamento del gestionale (teleassistenza), una ottimizzazione delle competenze dei professionisti (validazione a distanza), la garanzia di una pronta segnalazione delle situazioni ad alto rischio clinico (valori critici), una riduzione dei tempi di risposta (validazione parziale) e profili specifici per diversi "clinical settings". Classificare, archiviare e richiamare dati e immagini sono strumenti particolarmente utili per condividere e standardizzare l'attività del settore sia per la formazione dei professionisti. L'elaborazione statistica è un potente mezzo per anticipare eventuali criticità. I risultati ci spingono a proseguire nel cogliere le potenzialità offerte dall'informatica.

ESPERIENZE IN ITALIA ED ALL'ESTERO SULLA FORMAZIONE DEL TECNICO DI LABORATORIO BIOMEDICO: L'UNIVERSITA' TELEMATICA

C-04

S. Lazzerini, F. Como¹

Laboratorio Chimica Clinica ed Ematologia - Nuovo Ospedale San Giovanni di Dio - Firenze, *ASL 22 - Novi Ligure - Alessandria

Scopo del lavoro: L'Università ha lo scopo di operare nella formazione, qualificazione e diffusione della cultura adeguando il proprio intervento alle mutevoli condizioni del sistema socio-economico e tecnologico; per il perseguimento di tali obiettivi l'Università oltre che attività di ricerca, sperimentazione e studio, ai sensi del Decreto Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca (MIUR) del 17 aprile 2003, svolge attività formativa utilizzando le metodologie e tecnologie informatiche e telematiche della formazione a distanza.

E' un nuovo modello di Università che, per quanto riguarda gli ordinamenti didattici, non differisce da quelle tradizionali, essendo tuttavia la metodologia dell'insegnamento completamente innovativa.

Materiali e metodi: La rapida diffusione della banda larga e la conseguente diffusione degli atenei on line hanno consentito di superare la necessità di una frequenza diretta ai corsi, infatti non è più indispensabile essere presenti in facoltà ed entrare in contatto diretto con professori, assistenti ed altri studenti; la tecnologia digitale e l'utilizzazione di strumenti telematici offrono nuove possibilità nel campo della didattica e l'e-learning rappresenta una metodologia di formazione innovativa in cui convergono due tipologie didattiche: la formazione a distanza ed il "computer based training".

L'e-learning, cioè l'apprendimento in rete con l'introduzione dei mezzi di comunicazione informatici, avviene quando si comincia a verificare quel tipo di apprendimento "collaborativo" che è l'anima di questo tipo di didattica.

Risultati: L'Italia, allineandosi con il piano d'azione sull'e-learning dell'Unione Europea (L 19/10/1999), ha perseguito l'obiettivo di raggiungere un target di utenti finora escluso dal percorso universitario tradizionale (studenti lavoratori, malati, residenti all'estero, diversamente abili); questo ha consentito alle università italiane di aumentare l'offerta formativa, contribuendo in modo significativo alla crescita professionale di tutti i fruitori dell'e-learning.

Discussione e conclusioni: Negli ultimi anni sono nate molte università telematiche, sia grazie alla risoluzione del Consiglio dei Ministri dell'Istruzione dell'Unione Europea (13/07/2001) che alla decisione 2318/2003/CE (5/12/2003) del Parlamento e del Consiglio Europeo contenente un programma per il triennio 2004 – 2006 "per l'effettiva integrazione delle tecnologie dell'informazione e delle comunicazioni nei sistemi d'istruzione e formazione in Europa".

ANALISI DECENTRATE. ATTIVITA' DI MONITORAGGIO

C-05

A. Villani¹, M. Caputo²

¹Pinerolo, Torino; ²Bussolengo, Verona

Scopo del lavoro. Monitoraggio (analisi, valutazione) delle esperienze e dei risultati ottenuti nei contesti operativi, finalizzata ad approfondire la conoscenza di alcuni aspetti organizzativi e conoscitivi delle analisi decentrate, creare le premesse per ulteriori sviluppi del quadro conoscitivo evidenziando anche gli ambiti per effettuare eventuali e/o sistematici approfondimenti.

Materiali e Metodi. Distribuzione di un questionario, tendente ad acquisire informazioni sulla presenza, le modalità organizzative e le risorse impiegate in sistemi di Diagnostica decentrata. Lo schema è stato distribuito ed elaborato nel periodo marzo 2008 – gennaio 2009. I quesiti, limitati a meno di 15 per non appesantire l'impianto, sono stati formulati con scelta multipla di risposta e sono tutti indirizzati ad acquisire dati sulle caratteristiche dell'assetto organizzativo, forme e contenuti di professionalità specialistici, coinvolgimento della componente clinica e presenza e livello di governance da parte del laboratorio.

Risultati. Hanno risposto una trentina di laboratori del Centro-Nord Italia e della Campania. Le tipologie di risposta sono state elaborate in forma grafica e sono stati annotati suggerimenti e commenti significativi al fine della comprensione delle motivazioni alla base della installazione e delle prospettive di sviluppo. Tra le criticità emerse la mancata individuazione di responsabilità del Laboratorio sulla strumentazione e la non tracciabilità delle procedure diagnostiche. Inoltre il Controllo di qualità risulta estremamente frammentato ed attribuito a figure professionali molto differenziate.

Discussione conclusione. Il POCT è oggi una realtà operativa. La sua adozione può portare alla riduzione del TAT e miglioramento degli outcome clinico. Ci sono anche le premesse per convertire questi elementi in un miglioramento significativo del rapporto costo/beneficio del processo assistenziale. Soluzione organizzativa più affidabile che in passato, i vantaggi sono diversi: ottimale utilizzo delle risorse e del personale, tempi di risposta rapidi, riduzione della movimentazione di campioni e referti.

Tra gli obiettivi dei proponenti del questionario non rientrava la presunzione di riuscire a mappare in maniera esaustiva un fenomeno complesso ed articolato come quello della Diagnostica decentrata. Le modeste risorse a disposizione e le oggettive limitazioni ad una capillare penetrazione di questo strumento di indagine su una realtà storicamente lontana da qualsiasi tentativo di sia pur primitiva standardizzazione non potevano far prevedere niente del genere. Tuttavia crediamo di poter affermare che il lavoro svolto rivesta comunque un interesse per tutti coloro che a vario titolo sono coinvolti in questa tematica o lo saranno nel prossimo futuro. I quesiti riflettono i punti principali che è comunque necessario affrontare nel momento in cui si decide di fare ricorso alle opportunità che questa tecnologia mette a disposizione. Le risposte, per quanto ridotte di numero e relative solo ad una parte del territorio nazionale, rappresentano una buona base di partenza per lo sforzo che il Gruppo di studio POCT della SIMeL intende portare avanti nei prossimi mesi. La pubblicazione di un Position Statement stilato con la collaborazione di tutti i portatori di interesse che avranno voluto collaborare tenderà la sintesi su cui fondare l'indispensabile azione di governance che la Professione deve inevitabilmente assumere in quest'area strategica della Diagnostica di Laboratorio.

FORMAZIONE E ABILITAZIONE DEL PERSONALE DI REPARTO ALL'UTILIZZO DI UN SISTEMA DI IDENTIFICAZIONE CERTA DEI PAZIENTI DA SOTTOPORRE A TRASFUSIONE

C-06

B. Milanese¹, L. Manisco², A. Lama², P. Prandini², F. Santangelo², L. Bettoni², G. Del Giudice², L. Zentili³, R. Goglionè³, M. Viganò²

¹Dipartimento Medicina di Laboratorio e Laboratorio di Patologia Clinica A.O Desenzano (BS); ²Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale A.O Desenzano(BS); ³Ufficio Formazione e Aggiornamento A.O Desenzano (BS)

Scopo del lavoro: l'adozione da parte dell'Azienda Ospedaliera di Desenzano del Garda di un sistema elettronico da utilizzarsi in Reparto in 2 momenti critici del Processo trasfusionale ossia il prelievo del campione per gli esami pretrasfusionali e la trasfusione dell'emocomponente, ha condotto il Dipartimento di Medicina di Laboratorio, in collaborazione con il Servizio di Formazione e Aggiornamento Aziendale, a predisporre un piano di formazione e addestramento per tutti gli utilizzatori dei Reparti presenti nei 3 Presidi dell'Azienda Ospedaliera

Materiali e Metodi: il piano di formazione e addestramento, previsto nell'arco di tempo compreso tra Aprile e Novembre 2009, si compone di: -40 edizioni di un corso teorico della durata di 2 ore con l'obbligo di frequenza, rivolto a non più di 30 operatori per volta. Durante il corso sono illustrati a tutti i partecipanti le modalità di gestione del processo trasfusionale, le conseguenze che gli errori di identificazione possono avere sul Paziente e viene presentato il dispositivo adottato; -corso pratico, svolto nei Reparti che progressivamente implementano il sistema, in cui ogni operatore deve esercitarsi all'utilizzo in tutte le sue fasi.

Risultati: nel periodo Aprile-Agosto 2009 sono state effettuate 12 edizioni del corso teorico con il coinvolgimento di 4 Reparti per ciascun Presidio, che hanno visto la partecipazione di 248 operatori (89,8% dei convocati). La parte pratica è stata svolta ad oggi nei Reparti di Ortopedia e Cardiologia del Presidio di Desenzano. Alla fine del corso pratico a ciascun Reparto è stata consegnata la Procedura Aziendale "Utilizzo del sistema di sicurezza trasfusionale al posto letto" mentre a ciascun partecipante è stato consegnato un promemoria d'uso tascabile e una procedura riassuntiva dei principali aspetti critici del processo con riferimento a cosa fare e a cosa non fare. Per ogni operatore è stata inoltre compilata una scheda di formazione che costituisce un'abilitazione all'utilizzo del dispositivo.

Discussione e Conclusioni: nella nostra esperienza la formazione predisposta rappresenta, oltre che una garanzia specifica per l'utilizzo del sistema elettronico adottato, anche un'occasione per sensibilizzare gli operatori rispetto ai problemi di identificazione dei pazienti in generale che possono anche essere origine di errore mortale.

ESAMI DI AUTOIMMUNITA': VALUTAZIONE ECONOMICA DI UN APPROCCIO A DUE STEP (SCREENING + MONOTEST)

C-07

C. Radaelli, F. Varallo, T. Merlo, S. Carraturo, S. Colombara, A. Luciano, F. Rossi

Patol. Clinica – Serv. Immunotrasf. Lab. Autoimmunità, A.O. S. Gerardo di Monza

Scopo del lavoro. Nel nostro laboratorio di autoimmunità per oltre 15 anni i test Elisa che richiedono risposte multiple (es. cardiopina IgG e IgM) sono stati eseguiti utilizzando kit con coniugati separati (metodologia tradizionale). Da quasi due anni abbiamo adottato un nuovo approccio metodologico: utilizziamo kit di screening (in grado di rilevare contemporaneamente le componenti anticorpali o gli antigeni bersaglio) per discriminare i campioni positivi dai negativi e in seguito testiamo solo i positivi su un analizzatore monotest per definire la classe anticorpale o l'antigene specifico. Scopo del lavoro è valutare se ci sono dei vantaggi economici utilizzando la seconda metodologia.

Materiali e metodi. Abbiamo messo a confronto i due differenti approcci metodologici supponendo di avere applicato le due metodologie agli stessi campioni. Sono stati considerati i campioni dell'anno 2008 (8496) processati con metodo Elisa (Orgentec) su analizzatore DSX (Technogenetics) di cui: 1769 per ANCA-PR3/MPO, 3209 per tTG-IgA/G, 1459 per AGA-IgA/G, 1683 per Cardiopina-IgG/M/A, 376 per B2GPI-IgG/M/A. Sono stati rilevati 766 positivi che sono stati processati con analizzatore monotest ALEGRIA (Orgentec; Technogenetics): 111 per ANCA-PR3/MPO, 188 per tTG-IgA/G, 312 per AGA-IgA/G, 100 per Cardiopina-IgG/M, 55 per B2GPI-IgG/M. Le formule per comparare i costi delle due metodologie sono: per metodo tradizionale $n2a$ (n =numero campioni, a =costo/esame/pozzetto); per nuovo metodo $na+k2d$ (d =costo monotest, k =numero positivi); è possibile calcolare la % di positivi massima oltre la quale la nuova metodologia non è più conveniente applicando la formula: $n2a=na+K2d$ con $n=100$ e K l'incognita.

Risultati. Nel nostro laboratorio il raffronto tra l'approccio metodologico tradizionale e quello nuovo ha evidenziato un risparmio economico complessivo di circa il 30% (per noi 30.000 Euro) a vantaggio del secondo, considerato anche il risparmio dovuto al dimezzamento del numero delle curve di taratura. Le variabili intrinseche sono la percentuale di positivi di ogni singolo laboratorio e i prezzi applicati a ciascun esame.

Discussione e conclusioni: Ogni laboratorio cerca la ottimizzazione del flusso degli esami in dipendenza della propria realtà: numero esami, operatori, tipo di pazienti, risorse. La possibilità di adottare una nuova metodologia di lavoro è legata all'impiego di due analizzatori per esami Elisa di cui uno per lo screening iniziale con le tradizionali piastre, l'altro per conferma dei positivi con monotest. I risultati (a parità degli standard di qualità) ci hanno indotto ad adottare di routine questa politica che ci permette, nelle nostre condizioni operative, un significativo risparmio economico.

STANDARDIZZAZIONE NELLA VALIDAZIONE EMATOLOGICA E TECNOLOGIE DIVERSE: UNA POSSIBILE SOLUZIONE

C-08

M. Golato, G. Ciancaglini, F. Di Luca, F. Febbo, F. Indino, P. Pasquini

Patologia Clinica O.C. Lanciano

Scopo del Lavoro. Automatizzare la standardizzazione della validazione ematologica in un laboratorio certificato, su dati provenienti da contaglobuli con tecnologia analitica diversa. Nel nostro laboratorio erano presenti da circa 20 anni strumenti Siemens, di cui l'ultimo in dotazione è Advia2120. Abbiamo deciso di affiancare uno strumento con filosofia analitica diversa e con parametri aggiuntivi per ottimizzare, con i differenti sincretismi tecnologici, la gestione dei pazienti ematologici; pertanto, dal 2007 abbiamo inserito SysmexXE-2100. Al contempo è stato necessario introdurre un middleware di validazione DMS® (Dasit Management System) che consentisse: di standardizzare la validazione di campioni analizzati dai due strumenti e di avere un unico database completo di grafici, parametri e storia clinica del paziente.

Materiali e Metodi. Sysmex XE-2100: lettura di RBC/PLT-metodo impedenziometrico; lettura di WBC, Formula, Reticolociti, Eritroblasti, RBC/PLT ottici-metodo ottico laser in fluorescenza con coloranti polimetinici. Advia2120: lettura di RBC, PLT e Reticolociti-metodo ottico; lettura di WBC e formula-metodo ottico in citochimica. Le regole sono state costruite in base a: costante numerica, limiti anormalità/aberranza, età, sesso, reparto, segnalazioni, DeltaCheck, 1analisi, patologia del paziente, sfruttando l'opportunità di ripetere i campioni su una tecnologia diversa. Tutto ciò consente l'applicazione automatica di protocolli di revisione differenziati. Personale tecnico: diluizioni, ripetizioni su altra tecnologia (deficit mieloperossidasi, flag NRBC, crioglobuline, LUC), richiesta secondo prelievo (aggregati piastrinici), esecuzione con altro anticoagulante. Personale laureato: plausibilità del dato, reflex test (Reticolociti se HB bassa, IPF se PLT basse, FRC se allarmi schistociti), approfondimenti diagnostici (osservazione microscopica, immunofenotipo, ago aspirato midollare), validazione manuale, gestione clinica.

Risultati. Con l'utilizzo di DMS abbiamo inserito le nostre regole per automatizzare e standardizzare il processo di validazione. Attualmente il 34% dei campioni vengono fermati dalle regole (riduzione del 40% rispetto all'introduzione del sistema), dei quali il 95% sono validati manualmente con l'ausilio della storia clinica del paziente e il 5% viene strisciato. La % di riduzione degli strisci è stata del 33%.

Discussione e Conclusioni. La standardizzazione automatizzata, tramite DMS, ha garantito anche alla persona meno esperta di avere binari certi e prestabiliti da percorrere, ha aumentato l'efficacia del processo di validazione con selezione automatica dei campioni in cui sono necessari approfondimenti diagnostici, ha ottimizzato la gestione del paziente ematologico e ha migliorato il controllo del rischio clinico.

INCONTRI DI FORMAZIONE SUL CAMPO (FSC) DEI SERVIZI DI PATOLOGIA CLINICA DELLA ASL TO4: FORMAZIONE E QUALITÀ, LAVORARE SUI PROBLEMI

C-09

E. Stacchini, A. Ferrini

Dipartimento di Patologia clinica, ASL TO4, Ivrea

Scopo del lavoro: L'ECM è finalizzata a migliorare la qualità dei professionisti sanitari, per assicurare prestazioni adeguate ed appropriate al cittadino. La formazione sull'adulto è efficace se legata a problemi lavorativi concreti e la rilevazione dei bisogni formativi è componente essenziale del processo formativo. In seguito a queste riflessioni, abbiamo realizzato nel 2008 un corso ECM sull'analisi dei fabbisogni formativi e delle criticità presenti nel nostro Dpt.

Materiali e metodi: Il corso ha coinvolto le tre discipline del Dpt (multidisciplinarietà), le cinque professioni dell'equipe (interprofessionalità) ed è stato replicato in 5 edizioni, nelle sedi dei Servizi di Patologia clinica del Dpt (multiterritorialità). 47 le ore totali di formazione (spalmate in modo continuativo su 7 mesi), di cui il 90,7% condotta sul campo (FSC) e accompagnata da tutoraggio. I crediti formativi assegnati dal sistema ECM regionale sono stati 40. A livello di progettazione sono stati inseriti Indicatori di valutazione dell'efficacia formativa.

Risultati: L'analisi dei fabbisogni formativi ha evidenziato un gap di comunicazione delle innovazioni scientifico-tecnologiche tra i Servizi del Dpt e una netta preferenza dei discenti verso tipologie formative interattive (FSC). Le criticità riscontrate in ambito lavorativo sono state prevalenti nella fase preanalitica, in accordo con i dati della letteratura.

Discussione e Conclusioni: I risultati hanno permesso di indirizzare nel 2009, in modo mirato e continuativo, la progettazione di due corsi ECM: "Progetto di miglioramento della fase pre-analitica" (aperto agli infermieri esterni al Dpt) e "Il trasferimento delle innovazioni scientifico-tecnologiche all'interno del Dpt". La FSC ha aumentato motivazione e partecipazione del personale (alti indici di gradimento). Gli Indicatori di valutazione dei risultati hanno permesso di individuare abilità cognitive, operative e relazionali acquisite. Punti di forza del progetto: innovatività del sistema metodologico (analisi delle ricadute organizzative a distanza di tempo), coerenza con gli obiettivi regionali-aziendali, sviluppo formativo professionale, esemplarità (diffusione in tutti i Servizi del Dpt), trasferibilità ad altre realtà analoghe e riproducibilità nella stessa realtà operativa. L'ECM può così diventare, all'interno del governo clinico, strumento strategico del cambiamento organizzativo, finalizzato al miglioramento continuo dei processi assistenziali, per fornire ai cittadini un servizio sanitario di qualità.

APPLICAZIONE DELLA FMEA AL PAZIENTE CON TRAPIANTO RENALE: DAL PRIMO CONTATTO CON L'AMBULATORIO TRAPIANTI FINO ALLA RISPOSTA DEL LABORATORIO AL CLINICO E LA CONSEGUENTE AZIONE CLINICA INTRAPRESA

C-10

E. Stacchini¹, A. Ferrini¹, P. Belardi²

¹Dipartimento di Patologia clinica, ²Struttura Complessa Nefrologia e Dialisi ASL TO4, Ivrea

Scopo del lavoro: "Il governo clinico è il contesto in cui i Servizi Sanitari si rendono responsabili del miglioramento continuo della qualità dell'assistenza, garantendo elevati livelli di cura attraverso la creazione di un ambiente in cui l'eccellenza clinica si sviluppa". La FMEA analizza proattivamente, in processi definiti, aree di rischio per il paziente, individuando priorità di trattamento. Dato l'elevato numero di pazienti trapiantati di rene in Piemonte (3043 al 31/07/2009, dati del Centro Reg. Trapianti), il nostro Dpt con la SC di Nefrologia, ASL TO4, Ivrea (cui afferiscono circa 90 pazienti con trapianto renale), ha applicato la FMEA al processo "monitoraggio della terapia immunosoppressiva", per individuare azioni di miglioramento.

Materiali e metodi: Popolazione oggetto di studio è rappresentata da circa 90 pazienti con trapianto renale, afferenti all'ambulatorio trapianti, S.C. Nefrologia di Ivrea. E' stato condotto un audit clinico di processo (input: primo contatto del paziente trapiantato con l'ambulatorio, out-put: rilascio del test di laboratorio al nefrologo e azione clinica intrapresa). Il GdL multidisciplinare e interprofessionale ha lavorato secondo la modalità del "gruppo nominale". Il processo è stato suddiviso in fase pre-analitica, analitica e post-analitica; ogni fase in attività e individuati possibili eventi, eventi avversi e azioni di contenimento. Ad ogni evento è stato assegnato un indice di rischio (IRC) ed elaborata la matrice di aree ad alto, medio e basso rischio.

Risultati: Dalla matrice di prioritizzazione dei rischi, gli eventi a maggiore IRC sono nella fase pre-analitica e post-analitica, in area di rischio medio. Non si evidenziano eventi ad alto rischio. Sono in studio le priorità di trattamento, volutamente indirizzate da un audit in corso, rivolto al paziente.

Conclusioni: La FMEA è parsa utile per analizzare i rischi del paziente e individuare azioni di trattamento, se usata da professionisti esperti e calati specificamente nel processo analizzato. Il punto critico riguarda il peso dato a gravità, probabilità e rilevabilità, legato all'uso di supporti come: analisi di letteratura scientifica, non conformità specifiche, incident reporting, reclami e benchmarking con realtà analoghe. L'audit dovrebbe interessare tutti gli attori del processo, compresi i pazienti (empowerment). L'esperienza condotta ci ha fornito una ottima occasione per uscire dal laboratorio e recarci nel setting clinico, attivando stimoli riflessivi sull'attività lavorativa e meccanismi di collaborazione multidisciplinare e interprofessionale essenziali per un approccio di qualità ai processi assistenziali.

LO SCREENING COMBINATO DELLE CROMOSOMOPATIE FETALI E IMPATTO SULLA DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

C-11

A. De Angeli, D. Armotti, R. Maffei, G. Peterlini, V. Curci, M. Carbone¹, C. Bonifazi¹, A. Taddia¹, M. Schinella, M. Ioppi¹

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale "S. Maria del Carmine" Rovereto

¹U.O di Ginecologia ed Ostetricia, Ospedale "S. Maria del Carmine" Rovereto

Scopo: un test di screening per anomalie cromosomiche, come la misurazione della Translucenza Nucale (NT) o il dosaggio plasmatico dei test free-betaHCG e PAPP-A, ha consentito di ottenere un aumento dell'efficienza dei programmi di diagnosi prenatale, a fronte della diminuzione drastica del numero dei test invasivi e quindi del numero di feti sani persi a causa della loro esecuzione. Lo scopo di questo studio è quello di valutare la sensibilità, specificità e il tasso di falsi positivi dell'NT e in un secondo tempo del test combinato, ultrasonografico e biochimico su una popolazione di gravide non selezionate, e di evidenziare l'eventuale riduzione delle procedure invasive.

Materiali e metodi: da novembre 2005 ad agosto 2009, presso l'U.O di Ginecologia ed Ostetricia dell'Ospedale di Rovereto, sono state esaminate 2144 pazienti tra l'11° e la 13° settimana di gravidanza. In un primo periodo, 447 pazienti sono state sottoposte a screening ultrasonografico (misurazione NT), conseguentemente altre 1697 pazienti sono state sottoposte a screening combinato (NT + dosaggio plasmatico dei test free-betaHCG e PAPP-A su analizzatore Kriptor-Dasit).

Risultati: nel primo periodo, in cui è stata eseguita la sola misurazione ecografia dell'NT, la sensibilità e la specificità del test erano dell'80 e 93% rispettivamente, con un tasso di falsi positivi del 7%. Si è verificato un falso negativo. Nel secondo periodo, dove allo screening ultrasonografico è stato associato quello biochimico, la sensibilità è stata del 100%, con una specificità del 96%, un tasso di falsi positivi del 4,7% e nessun falso negativo. Nel primo periodo, delle 109 pazienti di età superiore ai 35 anni (24% della popolazione esaminata) il 37,6% è stato sottoposto a diagnosi invasiva, mentre nel secondo periodo, delle 271 pazienti di età > ai 35 anni (23% della popolazione esaminata) solo il 16,2% ha eseguito villocentesi o amniocentesi.

Conclusioni: lo screening ultrasonografico ed in particolare quello combinato presenta molteplici vantaggi: la non invasività, il costo contenuto e l'alta sensibilità. La superiorità, in termini di sensibilità del test combinato, rispetto alla sola misurazione dell'NT, è stata confermata anche nella nostra casistica. Lo screening combinato si è rivelato un test efficace sia nella popolazione a basso rischio (età inferiore ai 35 anni), non avente accesso diretto alla diagnosi invasiva, sia nelle donne con età superiore ai 35 anni. Nel nostro ospedale dopo l'introduzione del test combinato le amniocentesi eseguite in donne con età superiore ai 35 anni si sono ridotte di oltre il 50%.

ANALISI ORGANIZZATIVA DEL LABORATORIO SECONDO L'ACTIVITY BASED COSTING (ABC) PER LA DEFINIZIONE DEI COSTI STANDARD

C-12

M. Mori

E.O. Ospedali Galliera - Genova

Scopo del lavoro: definire il costo pieno di prodotto focalizzando le attività che operano per la prestazione con l'analisi e la contabilità dei costi secondo l'Activity Based Costing (ABC).

Materiali e Metodi. Ci siamo avvalsi del programma sw FileMaker v9. Le attività sono state raggruppate in sei macro attività relative al grado di complessità e di automazione, evitando di appesantire eccessivamente l'analisi. I diversi pesi sono stati scomposti nel driver delle risorse, secondo le varie tipologie di personale e la specifica partecipazione attiva. La prima fase del sistema ABC si è basata sull'identificazione dell'attività attraverso dati già disponibili e sull'analisi bottom-up. La seconda fase ha riguardato l'allocazione dei costi delle risorse alle attività. Per ciascun tipo di prestazione è stato calcolato l'effettivo costo pieno, comprendendo i test utilizzati per le calibrazioni e controlli ed una percentuale stimata di reflex test. La terza fase ABC ha compreso l'allocazione dei costi dell'attività ai prodotti.

Risultati. La tipologia di report del software sono: 1) analisi dei costi per prestazione/servizio (analisi dei costi di ogni prestazione per aggregati di costo, costi totali per tutte le prestazioni, costi medi unitari, sostenibilità, posizionamento); 2) sintesi costi medi unitari (confronto tra costi specifici medi unitari di ogni prestazione ed il risultato economico rispetto alla tariffa); 3) analisi del benchmarking per la prestazione/ servizio (analisi di benchmarking di ogni prestazione, dapprima impostato con noi stessi per apprezzare gli scostamenti nel tempo); 4) report del mix delle prestazioni ricercate: l'analisi dei costi totali sostenuti per le prestazioni, ripartiti per attività, e l'analisi di benchmarking strategico, riferito al costo medio unitario per prestazione, con l'indicazione della sostenibilità (costi totali fissi/tariffa media unitaria o benchmarking specifico medio unitario - costo medio unitario per medico/altro laureato/ tecnico/infermiere/materiali) e del posizionamento (differenza tra totale prestazioni finali e sostenibilità).

Discussione e conclusioni. L'utilizzo dei costi standard consente di: a) gestire le analisi dei dati potendosi concentrare sugli scostamenti, rilevando dati quasi in tempo reale al di fuori delle previsioni; b) motivare il personale rendendolo partecipe al processo di miglioramento continuo; c) valutare la performance delle varie linee analitiche, definendo limiti e risultati delle singole aree diagnostiche di laboratorio; d) aumentare la sensibilità interna alle tematiche dei costi; e) essere un mezzo obiettivo di considerazione nell'ambito della contrattazione di budget. La definizione degli standard deve risultare dalla collaborazione tra diverse funzioni aziendali: contabilità, progettazione, produzione, acquisti.

VALUTAZIONE DELLA INTEGRAZIONE DELLA DIAGNOSTICA SIEROLOGICA SU VITROS 5600 (ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS – JOHNSON & JOHNSON) E STUDIO DI COMPARAZIONE DEL COMPLESSO TORC DI RECENTE INTRODUZIONE, VERSO IMMULITE 2000 (DPC-SIEMENS)

C-13

E. Bernardi, G. Cocchi, B. Milanese

Laboratori di Patologia Clinica (Desenzano-Lonato, Gavardo-Salò, Manerbio-Leno) A.O. Desenzano del Garda (BS)

Scopo: la finalità ad operare per il miglioramento della Qualità globale dell' Organizzazione dei Laboratori Aziendali, minimizzando l'impiego di personale e i costi di gestione, pur mantenendo inalterata la qualità del dato analitico, ci ha indotti ad implementare sullo strumento Vitros 5600 (analizzatore integrato di recente introduzione, Ortho Clinical Diagnostics-Johnson&Johnson) oltre ai dosaggi di biochimica clinica e delle proteine plasmatiche, anche quelli della diagnostica della Sierologia Infettiva: ricerche di anticorpi del complesso ToRC, prima eseguite su Immulite 2000 (Siemens), dell'Epatite A,B,C e HIV prima eseguite su Vitros Eci (Ortho Clinical Diagnostics-J&J). Lo scopo dello studio è stato quello di valutare: 1) prestazioni analitiche di Vitros 5600 nei test di recente introduzione del profilo ToRC - 2) ricaduta della scelta di consolidamento sull'intero processo operativo e gestionale.

Materiali e metodi: sono stati analizzati sieri ottenuti dalla routine (200 per Toxo IgG e 200 IgM, 60 per Rosolia IgG e 60 IgM, 40 per CMV IgG e 40 IgM) e analizzati su Vitros 5600 (Ortho Clinical Diagnostics) che utilizza un metodo in chemiluminescenza potenziata e su Immulite 2000 (DPC-Siemens) che utilizza un metodo in chemiluminescenza in fase solida. I test IgM risultati positivi o border-line sono stati rideterminati con il metodo VIDAS (BioMérieux). E' stata calcolata: la concordanza tra metodi, la specificità e la sensibilità relativa.

Risultati: -1) dal confronto tra test del profilo ToRC risultano agreement di 93,91%, sensibilità relativa 86,6%, specificità relativa 94,81%.-2) recupero di 1 unità di personale tecnico da dedicare ad altra attività; anticipo stampa referti giornalieri di 30' per l'utilizzo di unica provetta da caricare direttamente sullo strumento anticipatamente rispetto ad aliquote precedente previste (riduzione TAT routine)

Conclusioni: dalle analisi preliminari le performance analitiche dei test dei due Sistemi confrontati si sono dimostrate sovrapponibili, entrambe validi per uno screening di primo livello; inoltre il test CMV IgG Ortho, a diversità del relativo test Siemens, è standardizzato e fornisce risultati in UI. Operativamente l'integrazione della diagnostica sierologica sul Vitros 5600 ci consente di razionalizzare la gestione dei campioni e diminuire il TAT complessivo dell'intera routine, con riduzione della movimentazione di aliquote e con conseguente riduzione del rischio d'errore, dell'impiego di personale e dei costi di gestione e quindi: ottimizzazione complessiva del processo operativo e gestionale.

BALANCED SCORECARD: A MULTIDIMENSIONAL EVALUATION OF PERFORMANCE

C-14

G. Guerra¹, A. Verzola², R. Bentivegna³, A. Mandini², R. Bernardoni¹, G. Carandina¹

¹Clinical Pathology Service, St. Anna University Hospital, Ferrara; ²Management Planning and Control, St. Anna University Hospital, Ferrara; ³Medical Direction Committee, St. Anna University Hospital, Ferrara

Aim of the study. The Balanced Scorecard (BSC) was applied in the Laboratory Service of the St. Anna University Hospital, to create value and to translate the company vision into a set of tactical objectives and measurable strategies.

Methods. Identification of the cause-effect relationships between the Key Performance Areas (KPA), the subobjectives of each KPA, Key Performance Indicators (KPI), definition of the weight of each objective in the global evaluation were preliminary defined, as well as the relevant indicators, standards, weights, frequency of detection, means of acquisition.

Results. Evaluation yielded a positive result for the majority of the objectives, the global result was satisfactory.

Conclusion. The BSC was proved to be an ideal point of contact between the financial and clinical dimensions of management. Moreover, all the employees were pleased to be evaluated not only for the financial outcomes, but also for the satisfaction of improving internal procedure, relationships with the community and their own growth/learning.

Mappa strategica del Laboratorio Analisi



SCREENING PRECOCE DELLE ANOMALIE CROMOSOMICHE: CONTRIBUTO DEL LABORATORIO

C-15

A. Conti¹, S. Gaino⁴, S. Poggi², D. Piccoli⁴, G. Iorizzo³, F. Lovison¹, M. Caputo⁴

¹U.O. Laboratorio Analisi cliniche e Microbiologia Osp. Thiene, ²The Fetal Medicine Center Verona, ³U.O. Ostetricia e Ginecologia Osp. Thiene, ⁴U.O. Laboratorio Analisi cliniche e Microbiologia Osp. Bussolengo

Scopo del lavoro: verificare l'impatto del Laboratorio sulla appropriatezza di un intervento sanitario complesso per la sfera emotiva di pazienti e famiglie e per le risorse richieste al sistema sanitario.

Metodi. 1789 donne in 2 anni. Percorso: 1) Visita counseling per illustrare benefici e limiti; 2) US per translucenza nucale e marker aneuploidia + prelievo per f-β HCG e PAPP-A (Kryptor, Dasit, Milano); 3) Calcolo del rischio (software ASTRAIA, Monaco, Germania). I dati di outcome sono stati elaborati tramite software ASTRAIA.

Risultati:

	Thiene Età ≥ 35 anni = 14%	Verona Età ≥ 35 anni = 31.4%
HCG		
5°	0.378	0.402
Mediana	0.967	0.958
95°	2.782	2.671
PAPP-A		
5°	0.395	0.430
Mediana	1.008	1.012
95°	2.175	2.184
>95°	6.2%	5.8%
<5°	6.1%	5.6%
Difetti attesi	6.4	4.2
Rischio stimato	≥1:300 nel 3%	≥1:300 nel 5%
Difetti trovati	2 T21 1 Mosaico 47XY+16	2 T21 2 T18 1 traslocazione bilanciata

Outcome: 1 IVG, 1 aborto spontaneo, 3 morti entro 10 g. dalla nascita. Complicanze: 7 ritardi crescita intrauterina e 5 pre-eclampsie.

Conclusioni: Il Laboratorio risulta pienamente integrato nel processo assistenziale. Le procedure sono accettate e compatibili con l'operatività complessiva. I dati biochimici offrono un valido sussidio decisionale sia nel trattamento di effettive alterazioni che nella valutazione complessiva della stratificazione del rischio di patologie su base cromosomica.

APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE NELLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON TROMBOEMBOLISMO VENOSO: UN'ESPERIENZA

C-16

M. Schinella¹, A. Pupillo¹, L. Lenzi², M. Mattarei², G. Mariotti³

¹U.O. Patologia Clinica Dipartimento Medicina di laboratorio, ²U.O. Medicina Interna, ³Direzione Sanitaria Ospedale S.Maria del Carmine – Rovereto APSS Trento

Introduzione: Il tromboembolismo venoso (TEV) coinvolge milioni di persone e costituisce un problema di rilevanza sociale. L'importanza di una tempestiva diagnosi e di una adeguata terapia anticoagulante (TA), sia in fase acuta che nel monitoraggio, è tale da rendere necessaria una riorganizzazione gestionale, sia intra che extraospedaliera, superando lo stretto ambito specialistico e prevedendo un approccio multidisciplinare e multiprofessionale. Partendo da questo presupposto da circa un anno si è tentato di creare un percorso intraospedaliero che prevede la gestione integrata del paziente con TEV.

Materiali e metodi. Dal gennaio 2008 è operativo un percorso diagnostico terapeutico intraospedaliero che coinvolge i medici della UO di Medicina Interna e della Patologia Clinica dell'Ospedale di Rovereto e la Direzione Sanitaria. Il percorso operativo elaborato prevede: inquadramento diagnostico presso l'U.O. di Medicina Interna, eventuale induzione di TA con tempi di degenza ridotti Affidamento del paziente all'ambulatorio di TA orale della Patologia Clinica per il monitoraggio, la stabilizzazione della terapia, la programmazione ed esecuzione dei test per trombofilia (secondo un protocollo standardizzato, condiviso e diffuso a livello ospedaliero), la gestione della TA nella esecuzione di eventuali manovre invasive necessarie ai fini del completo inquadramento diagnostico. Ritorno del paziente presso l'ambulatorio di Medicina Interna per valutazione finale.

Risultati. Dal gennaio 2008 a tutt'oggi sono stati gestiti 30 pazienti con diagnosi di TEV e precisamente 18 con trombosi venosa profonda, 10 con embolia polmonare e 2 pazienti con trombosi in sedi atipiche. 11 pazienti con TEV idiopatico, a distanza di sei mesi dall'evento trombotico, hanno eseguito lo screening trombofilico.

Discussione e conclusioni. Il vantaggio di tale approccio è soprattutto quello di inquadrare da un punto di vista etiopatogenetico la malattia tromboembolica venosa e garantire un percorso terapeutico e di monitoraggio. Altro indubbio vantaggio è quello di semplificare le modalità di accesso dei pazienti alle prestazioni specialistiche attraverso un percorso già pianificato. La definizione di protocolli condivisi a livello ospedaliero ha permesso di uniformare e razionalizzare le richieste di esami e favorire una maggiore condivisione tra i vari operatori nel fare counselling per la durata della TA e per le situazioni a rischio. Il futuro prevede un modello di gestione integrata ospedale/territorio attraverso il coinvolgimento di altre unità operative e dei medici di medicina generale.

ESPERIENZA QUINQUENNALE NELLA VALUTAZIONE DELL'ABUSO CRONICO D'ALCOOL TRAMITE UTILIZZO DELLA CARBOHYADRATE DEFICIENT TRANSFERRIN (CDT): USO INTEGRATO DI TEST IMMUNOLOGICO DIRETTO CDT N-LATEX E METODI SEPARATIVI CE E/O HPLC

C-17

M.T. Trevisan¹, G. Bonadonna¹, F. Bortolotti², F. Tagliaro²

¹U.O. di Laboratorio Dipartimento dei Servizi ULSS20 Verona; ²U.O. Tossicologia Forense Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica Università di Medicina e Chirurgia di Verona

Scopo del lavoro: Al laboratorio di analisi pervengono spesso richieste di dosaggi di CDT per la valutazione dell'idoneità al rilascio e/o al rinnovo della patente di guida. L'impiego in ambito forense di questo test e la sua introduzione nel repertorio delle analisi comporta l'introduzione di problematiche relative alla fase preanalitica (catena di custodia), analitica (metodo di conferma) e di refertazione (intervalli decisionali, interpretazione del risultato). Il presente lavoro descrive il protocollo finale adottato dall'U.O. di Laboratorio dell'ULSS20 di Verona e la valutazione di 5 anni di attività.

Metodo: Tenendo conto della realtà organizzativa e in accordo con le linee guida della SIMLA, si è scelto di eseguire il dosaggio della CDT presso l'U.O. di Laboratorio con un test di primo livello (N-LATEX CDT) e di sottoporre i risultati positivi e/o dubbi ad un test di II livello (HPLC o CE) presso il laboratorio di Tossicologia forense del D.M.S.P. dell'Univ. di Verona. L'introduzione della nuova metodica ha comportato due fasi, la prima con l'obiettivo di trovare la correlazione tra N-LATEX CDT e la metodica separativa di conferma CE e/o HPLC, la seconda con l'individuazione, tramite curve ROC, del cut-off a migliore sensibilità (100%), anche se a bassa specificità (80%). Nei 5 anni di utilizzo, il test è stato monitorato continuamente in funzione dei diversi lotti di antisiero.

Risultati: L'attuale valore cut-off di CDT per l'esecuzione del test di conferma è 2,2%, e deriva dal confronto tramite curve ROC dei dati di 1500 soggetti. La tracciabilità completa del processo, dal prelievo fino alla trasmissione dei risultati, è stata raggiunta con l'automazione di alcune operazioni (esecuzione del test su provetta primaria, invio del risultato ad host) e grazie un sistema esperto che, in funzione dei dati ottenuti dai test di I e/o II livello, genera liste di lavoro e coadiuva il dirigente nel controllo del risultato. L'organizzazione della catena di custodia garantisce sicurezza e tracciabilità di tutto il processo. L'87% dei dati è consegnato in giornata, mentre il 13% è sottoposto a conferma. L'introduzione del nuovo test è avvenuta senza acquisizione di nuova strumentazione e con risorse di personale invariate. In 5 anni di attività il numero di contestazioni dei risultati è stato trascurabile.

Conclusioni: I buoni risultati ottenuti sono il frutto della collaborazione tra U.O. di Laboratorio dell'ULSS20 e Tossicologia Forense del D.M.S.P. dell'Univ. di Verona in merito a integrazione di metodologie e condivisione di protocolli, e rappresenta, a nostro parere, un buon modello, esportabile in altre realtà dove l'elevato numero di richieste si deve coniugare a rapidità di consegna e affidabilità della risposta.

PROPOSTA PER UN PROFILO DI COMPETENZA DEL TECNICO SANITARIO DI LABORATORIO BIOMEDICO

C-18

T. Galai¹, M. Paiero², G. Casna³

¹Istituto di Farmacologia Clinica e Tossicologia- Azienda Ospedaliera S. Maria Misericordia, Udine; ²Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico, Università degli Studi di Udine; ³Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico, Università degli Studi di Verona, sede di Trento.

Scopo del lavoro. L'obiettivo dello studio è quello di evidenziare le principali competenze attese dai Servizi Diagnostici nei confronti del TSLB in fase di inserimento nei vari contesti lavorativi. Questa indagine, promossa da un gruppo di studio costituitosi nell'ambito della Commissione Nazionale dei Corsi di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico tenutasi il 9-10 maggio 2008 a Napoli, ha ritenuto importante avviare un confronto tra Formatori e Servizi per concordare un profilo di competenze essenziali che rispondano alle reali necessità ed alle tendenze di sviluppo dei laboratori, soddisfacendo criteri di fattibilità formativa.

Materiali e Metodi. La tecnica per raccogliere i dati è stata quella di sottoporre un questionario in formato elettronico ad un campione di indagine rappresentato da esperti sia del mondo della formazione che dei servizi. Il numero dei questionari inviati è di 650 unità. Il questionario è suddiviso in due parti: competenze generali e specifiche.

Risultati. Dall'analisi descrittiva dei dati, sia sul profilo di competenze generali che dovrebbero contraddistinguere la figura del TSLB, sia sul profilo specifico delle principali aree di laboratorio, emerge un consenso generale. La percentuale degli intervistati che ritiene irrinunciabili la maggior parte delle competenze elencate varia dal 70% al 93%. In particolare appare chiaro un consenso generale sia tra i Formatori che tra i Servizi, i quali richiedono un alto livello di competenza da parte del TSLB neolaureato sia nelle competenze generali come nelle principali aree di laboratorio.

Discussione e Conclusioni. Le competenze riguardanti la necessità della formazione e quelle legate alla collaborazione a progetti di ricerca sono percepite in modo diverso tra Servizi e Formatori. Da questo consenso generale si discostano le competenze riguardanti le abilità nelle manovre di pronto soccorso e di tecnica del prelievo venoso. Se si considera però la sommatoria delle risposte "irrinunciabile e abbastanza importante" tali competenze raggiungono mediamente un'approvazione del 60%. Inoltre le differenze nella percezione e nei livelli di attesa rilevati tra le diverse figure professionali coinvolte nella ricerca evidenziano come in una professione così multidisciplinare esistono ancora elementi di dubbio rispetto alla definizione del ruolo e delle relative funzioni. L'elenco delle competenze proposto vorrebbe rappresentare uno schema di riferimento generale per la figura del TSLB, con importanti contributi ed integrazioni in base alla specifica realtà lavorativa.

LA MOTIVAZIONE E LA CRESCITA DEI COLLABORATORI: CHE RUOLO HA IL COORDINATORE?

C-19

A. Ferrari¹, P. Rizzotti¹, A. Battistelli²

¹Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, OCM, Verona; ²Dipartimento di Psicologia e Antropologia Culturale, Università di Verona

Background: L'attività dei laboratori moderni è molto complessa e sempre più spesso emergono espressioni di insoddisfazione e demotivazione, aspetti poco approfonditi in letteratura rispetto al personale di laboratorio. Il Coordinatore, che lavora a stretto contatto con i collaboratori, può percepire meglio il clima lavorativo.

Obiettivo: Indagare le aree della motivazione e del comportamento lavorativo sulle quali il Coordinatore, di concerto con la Direzione del laboratorio, può intervenire per attuarne il miglioramento.

Materiali e metodi: È stata condotta una ricerca empirica rivolta a tutto il personale del Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche – Ospedale Civile Maggiore di Verona per valutare gli atteggiamenti e le motivazioni verso il lavoro. I dati sono stati rilevati mediante un questionario, strutturato in una sezione generale, per la rilevazione delle variabili anagrafico-lavorative, e una specifica, costruita su 10 scale, di 147 item complessivi, tratte dalla recente letteratura e adattate al contesto del laboratorio. Sono state studiate 26 variabili relative alle dimensioni del comportamento lavorativo motivato. La modalità di risposta era su scala Likert da 1 a 5 punti. I dati sono stati elaborati con il software SPSS 15.

Risultati: Sono risultati validi 95 questionari su 98. Il campione risulta essere mediamente proteso verso forme di motivazione più autonome (Self-Determination Theory) e di attaccamento affettivo verso l'organizzazione e ha espresso un buon livello di orientamento all'obiettivo e di soddisfazione lavorativa, mentre la percezione del supporto dei superiori, il coinvolgimento verso il lavoro e la partecipazione sono risultati più bassi. È stata condotta un'analisi della varianza (ANOVA) tra le diverse categorie professionali, rilevando differenze significative in 12 delle 26 dimensioni valutate. Il personale dirigente risulta più autonomamente motivato, soddisfatto per i contenuti del lavoro, coinvolto e partecipa nel lavoro e percepisce maggiore supporto da parte dei superiori, seguito dal personale sanitario e da quello non sanitario. Inoltre risulta un coinvolgimento nel lavoro più basso nel personale sanitario rispetto a quello non sanitario.

Discussione e conclusioni: La ricerca è una fotografia del Laboratorio e permette al Coordinatore di conoscere meglio i propri collaboratori e di individuare le aree sulle quali può attuare il miglioramento. I gruppi di lavoro multidisciplinari e interprofessionali, i progetti di miglioramento di Formazione sul Campo, l'applicazione di nuovi modelli organizzativi sono descritti come metodologie di lavoro che possono condurre a forme di maggiore motivazione autonoma e coinvolgimento verso il lavoro e l'organizzazione.

STUDIO MULTICENTRICO DEI CONTROLLI DI QUALITA' DEGLI EMOCOMPONENTI MEDIANTE LA CREAZIONE DI UN SISTEMA RETE ATTIVO A LIVELLO INTERREGIONALE

C-20

M. Marini¹, C. Nardi⁵, A. Birolini⁷, U. Bodini⁴, S. Braga¹, A. Bucciarelli¹⁴, A. Cairola⁸, M. Cefis⁶, O. Consolandi¹, A. Conti², G. Crovetto¹⁵, M. Lombardi¹, L. Mazzucco³, P. Liumbruno⁵, M.A. Saracino¹², L. Spatola¹, O. Vicari¹¹, M. Viganò¹³, L. Manisco¹³, A. Lama¹³, P. Prandini¹³, B. Milanese¹³

¹SIMT, A.O Spedali Civili, Brescia; ¹¹SIMT, A.O Ospedali Riuniti, Bergamo; ¹²SIMT, A.O ULSS12 Venezia; ¹³Dipartimento Medicina di Laboratorio e SIMT, A.O Desenzano d/G; ¹⁴SIMT, A.O USL8 Toscana; ²SIMT, A.O S. Carlo Borromeo, Milano; ³SIMT, A.O Alessandria; ⁴SIMT, A.O Cremona; ⁵SIMT, A.O USL8 Arezzo; ⁶SIMT, A.O Vimercate; ⁷SIMT, INT Milano; ⁸SIMT S. Giovanni Battista, Torino

Scopo del lavoro: Lo scopo del presente studio è quello di ampliare il Progetto già approvato nel 2006 a livello regionale (5° Piano Sangue Regione Lombardia) coinvolgendo più Servizi Trasfusionali sul territorio nazionale mediante un sistema informatico e un sistema rete in grado di raccogliere, elaborare e archiviare i dati relativi al CQE eseguiti in ciascun SIMT. L'attività consente di soddisfare tre obiettivi: 1) Gestione CQ interno 2) esportazione informatica dei risultati per statistica multicentrica-VEQ 3) realizzazione di medie periodiche di alcuni parametri

Materiali e Metodi: Per questo studio è stato realizzato il programma CQE.5 progettato dal SIMT di Brescia e installato presso tutti i SIMT partecipanti. Tale software ha permesso di trasformare i dati inseriti dai vari centri in file UNI esportabili verso un server elaboratore e di gestire i risultati ottenuti mediante il collegamento a un sito consultabile

Risultati: Sono stati scelti per l'elaborazione i seguenti emocomponenti e i relativi parametri di interesse clinico monitorati da tutti i SIMT partecipanti allo studio: sangue intero (vol;Hb;Hct;emolisi); emazie concentrate buffy-coat deplete in soluzione additiva (vol;Hb;Hct;WBC;Plt;emolisi); plasma fresco congelato (vol;WBC;Plt;Rbc;Fatt. VIII); plasma da aferesi (vol;Plt;WBC;Rbc;Fatt.VIII); concentrati piastrinici da pool di buffy-coat (vol;Plt;WBC;Rbc;pH); concentrati piastrinici da aferesi (vol;Plt;WBC;Rbc;pH); emazie leucodeplete in sol.additiva (vol;Hb;Hct;WBC). Per ogni parametro sono stati calcolati i seguenti dati statistici: media, val.min/max, DS 1-2, CV range

Discussione e Conclusioni: I dati elaborati hanno permesso ad ogni SIMT partecipante di comparare la propria posizione in termini qualitativi e quantitativi relativamente all'attività di produzione degli emocomponenti, tramite la visione di carte di controllo periodiche. Il contatto tra i centri partecipanti allo studio ha consentito inoltre lo scambio di informazioni ed il miglioramento dei controlli.

EFFICACIA DI UN SISTEMA DI CONTROLLO DI QUALITA' PER I COAGULOMETRI PORTATILI

C-21

S. Testa, O. Paoletti, L. Bassi, A. Alatri, A. Zimmermann, N. Delpero, E. Spotti

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Centro Emostasi e Trombosi. AO Istituti Ospitalieri, Cremona

Introduzione: Il Centro Emostasi e Trombosi di Cremona ha avviato nel 2002 un progetto di decentramento della gestione della Terapia Anticoagulante Orale (TAO) c/o sedi periferiche (Case di Riposo, medici di medicina generale), utilizzando i Coagulometri Portatili (CP) per l'esecuzione del PT/INR su sangue capillare. Per garantire un elevato standard di accuratezza e precisione è necessario attuare un programma di controllo di qualità (CQ).

Scopo del lavoro: Strutturare un sistema di CQ per assicurare la qualità del dato analitico utilizzato per la gestione della TAO, dal momento che attualmente non esiste un sistema di regole condivise che disciplini l'utilizzo dei CP in coagulazione.

Materiali e Metodi: Il Coagulometro del Laboratorio (STA-Roche) è considerato il sistema di riferimento. Nelle sedi periferiche è utilizzato il Coaguchek XS (Roche Diagnostic). Il protocollo di qualità prevede la valutazione di:

- Idoneità all'uso del CP: valutazione della precisione dello strumento (analisi di un pool di plasmi normali ripetuta 10 volte) considerata accettabile se $CV < 5\%$; valutazione dell'accuratezza, eseguendo in doppio 10 campioni patologici con $INR < 4.0$ e considerata adeguata per differenze di $INR < \pm 0.5$.
- Precisione per ogni seduta analitica: il laboratorio fornisce ad ogni sede le carte di Lewej-Jennings che vengono restituite compilate mensilmente. Il controllo interno, fornito dalla ditta, è eseguito all'inizio di ogni seduta e ogni 20 campioni; è accettabile una variabilità pari a $\pm 20\%$ rispetto al valore medio centrale
- Accuratezza trimestrale per l'affidabilità analitica dello strumento: 3 campioni a differente range terapeutico analizzati in doppio ogni trimestre. Accettabili differenze $d > 0.5$ unità di INR
- Valutazione esterna della qualità (NEQAS): considera sia il dato di laboratorio che gli aspetti clinici del trattamento, ovvero la correttezza della gestione globale della terapia.

Risultati: Nelle 9 sedi periferiche sono utilizzati 18 CP che effettuano 18210 test/anno. La precisione analitica è risultata soddisfacente e stabile nel tempo con valori medi sempre $< 5\%$. Il controllo dell'accuratezza ha permesso di evidenziare in 2 casi su 360 controlli eseguiti (0.55%) la necessità di una revisione strumentale. La verifica esterna di qualità NEQAS è risultata ottimale.

Conclusioni: Il protocollo per il CQ adottato c/o il nostro centro consente un controllo accurato e preciso dei CP in uso, garantendo la sicurezza del dato analitico e la conseguente corretta gestione terapeutica del paziente. Si auspica che le normative vigenti prevedano l'applicazione di analoghi protocolli di qualità in tutti i casi in cui la gestione della TAO avvenga attraverso l'uso di CP.

“LONG TERM BIOLOGICAL VARIABILITY” IN BIOCHIMICA CLINICA

C-22

V. Brescia, M. Tampoia, E. Mascolo, A. Losito, G. Urso, V. Montemurro, F. Di Serio
Patologia Clinica I, Policlinico Bari

Molti studi hanno valutato la variabilità biologica intraindividuale (CVI) ed interindividuale (CVG) degli analiti di biochimica clinica con tempi di osservazione inferiori a 6 mesi.

Scopo del nostro lavoro è stato di determinare la variabilità biologica su dati raccolti con un tempo di osservazione maggiore. *Materiali e Metodi.* Sono stati valutati 50 soggetti apparentemente sani, 29 maschi (età 22-45 anni) e 21 femmine (età 28-39 anni). Sono stati esclusi soggetti con uno o più analiti > al v.r. (condizione potenziale di malattia). Ciascun soggetto ha eseguito 4 determinazioni in un periodo di osservazione di 1 anno. Sono stati valutati 16 analiti su Dimension Rxl (Siemens).

L'analisi della varianza (ANOVA) è stata utilizzata per valutare la variabilità delle medie mensili del CQI e per il calcolo del CVI e del CVG. I dati sulla variabilità biologica, ottenuti sottraendo il CV analitico (CVA), sono stati confrontati con quelli della letteratura; inoltre è stato calcolato l'Indice di Individualità

Risultati. Vedi Tabella

Conclusioni. I nostri dati di CVI sono sovrapponibili a quelli della letteratura ed il CVA non ha ecceduto i criteri di accettabilità prefissati. Un sistema analitico stabile permette di valutare la variabilità biologica con campionamenti meno frequenti ed tempi più lunghi di osservazione.

ANALITI	UNITA'	Grande Media	CV _A %	CV _A % desiderabile	Westgard			nostro studio		
					CV _I %	CV _G %	II	CV _I %	CV _G %	II
S-Alfa-Amilasi pancreatica	UI/L	51,24	1,47	4,80	9,50	28,30	0,34	7,72	48,32	0,16
S-ALT	UI/L	34,95	3,91	12,20	24,30	41,60	0,58	7,72	22,28	0,35
S-AST	UI/L	22,21	3,97	6,00	11,90	17,90	0,66	13,79	37,19	0,37
S- Bilirubina Dir.	mg/dL	0,11	6,67	18,40	36,80	43,20	0,85	27,28	71,92	0,38
S-Bilirubina Tot.	mg/dL	0,53	9,39	12,00	23,80	39,00	0,61	17,99	34,74	0,52
S-Colesterolo HDL	mg/ml	48,41	3,06	3,60	7,10	19,70	0,36	7,90	32,81	0,24
S-Colesterolo Tot.	mg/dL	181,09	1,48	2,70	5,40	15,20	0,36	6,17	25,33	0,24
S-Creatinina	mg/dL	0,82	3,39	2,60	5,30	14,20	0,37	6,28	27,57	0,23
S-Fosfatasi Alcalina	UI/L	67,40	4,04	3,20	6,40	24,80	0,26	9,79	33,82	0,29
S-Ferro Totale	µg/dL	92,26	1,46	13,30	26,50	23,20	1,14	23,23	47,83	0,49
S-Glucosio	mg/dL	89,45	2,81	2,80	5,70	6,90	0,83	4,61	18,66	0,25
S-GGT	UI/L	34,95	2,80	6,90	13,80	41,00	0,34	6,08	37,87	0,16
S- Proteine Tot.	g/dL	7,21	1,20	1,40	2,70	4,00	0,68	1,99	5,94	0,34
S- Trigliceridi	mg/dL	81,81	2,41	10,50	20,90	37,20	0,56	18,99	75,37	0,25
S- Urato	mg/dL	4,90	2,63	4,50	9,00	17,60	0,51	8,54	45,87	0,19
S-Urea	mg/dL	35,28	5,60	6,20	12,30	18,30	0,67	3,87	28,56	0,14

DATI PRELIMINARI SULL'UTILIZZO DEL TEST DI BLAND-ALTMAN PER L'ALLINEAMENTO STRUMENTALE: UN'ESPERIENZA SU DUE ACCESS2® BECKMAN COULTER

C-23

E. Stenner¹, W. Micheli¹, A. Bussani², B. Biasioli²

¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Ospedali Riuniti di Trieste, ²FIM, Trieste

Scopo del lavoro. La qualità delle prestazioni analitiche viene garantita attraverso i controlli di qualità interni (CQI) e la verifica di qualità esterna (VEQ), poche sono invece le evidenze su come monitorare l'allineamento strumentale e quindi garantire una unicità di risposta intralaboratorio. Tale problematica risulta quanto mai cruciale per un parametro come la troponina, il cui aumento e/o calo delle determinazioni in serie è monitorato dal clinico, sia per definire una diagnosi che per accertare il successo o meno di una terapia. Non si tratta di verificare se i risultati di due strumenti sono correlati l'uno all'altro, quanto se vi è sovrapponibilità, ovvero se ci sia totale intercambiabilità tra gli strumenti presenti in laboratorio. A tale scopo abbiamo voluto indagare l'applicabilità del test di Bland-Altman (BA) per verificare l'agreement dei risultati dei controlli di qualità interni effettuati sui due Access2 presenti nel nostro laboratorio di urgenza per il dosaggio della Troponina. *Materiali e metodi.* Nel periodo luglio-agosto 2009, verificata giornalmente la precisione dei due Access2 presenti nel nostro laboratorio d'urgenza (sessione CQI, su tre livelli, superata secondo le regole di Westgard) si sono inseriti i risultati dei CQI giornalieri per il dosaggio della troponina, nel test di BA e se ne sono analizzate le differenze (plot delle differenze contro la media della coppia di misure).

Risultati. Si sono evidenziati, per il livello 1, 2 e 3 rispettivamente: a) scostamento rispetto allo 0: L1 -0.0045; L2 -0.056; L3 -0.11, b) IC al 95%: L1 (-0.047 e 0.038), L2 (-0.27 e 0.16), L3 (-0.71 e 0.49) c) deviazione standard. L1: 0.02, L2: 0.11, L3: 0.3. L'allineamento strumentale per questo parametro è risultato molto soddisfacente.

Discussione e conclusioni: dall'analisi di questi dati preliminari, si osserva come l'implementazione del test di BA nei protocolli per la valutazione della qualità dell'allineamento sia uno strumento statistico pratico ed efficace per identificare la presenza di anomalie nella coerenza di misure effettuate su due strumenti uguali. Tuttavia, emerge anche la difficoltà di definire un criterio oggettivo per determinare la soglia di accettabilità delle differenze riscontrate tra i due strumenti. La nostra decisione, al momento, è quella di definire un intervallo di confidenza pari, per ciascun valore medio definito da una coppia di valori, alla deviazione standard corrispondente al CV% definito dallo stato dell'arte per ciascun parametro.

RISULTATI DI UN PROCESSO DI AUDIT CONDOTTO NEL DIPARTIMENTO DI MEDICINA DI LABORATORIO DELL'A.O DI DESENZANO DEL GARDA: VALUTAZIONE APPROPRIATEZZA E CORRETTA COMPILAZIONE DELLA RICHIESTA TRASFUSIONALE

C-24

B. Milanesi¹, L. Manisco², A. Lama², P. Prandini², M. Viganò²

¹Dipartimento Medicina di Laboratorio e Laboratorio di Patologia Clinica A.O Desenzano(BS)

²Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale A.O Desenzano(BS)

Scopo del lavoro: il Dipartimento di Medicina di Laboratorio dell'A.O di Desenzano del Garda composto dai Servizi di Laboratorio Patologia Clinica, Anatomia Patologica, Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ha condotto, nel periodo da 01-01-2008 a 30-08-2008, un audit sull'appropriatezza della richiesta trasfusionale e della sua corretta compilazione nei 3 Presidi Ospedalieri Aziendali: Desenzano, Gavardo e Manerbio. Lo studio è stato preceduto da: -Implementazione di una nuova tipologia di richiesta emocomponenti, valutata dal Comitato Trasfusionale Ospedaliero, con definiti i parametri di appropriatezza per gli emocomponenti; -Aggiornamento della Guida ai Reparti Clinici presente sulla rete intranet; -Riunioni informative con i singoli Reparti.

Materiali e Metodi: sono stati individuati 2 indicatori da rilevare e monitorare con cadenza mensile:1) percentuale di richieste trasfusionali inappropriate 2) percentuale richieste e campioni biologici non completi. Nel periodo indicato sono state analizzate complessivamente 4199 richieste di emocomponenti; la prevalenza delle stesse ha riguardato i Reparti di Chirurgia Generale e Ortopedia, dove si è anche rilevato un diverso consumo di emocomponenti, pur in presenza di patologie analoghe.

Risultati: le richieste inappropriate sono state soltanto 2 ossia 0,047% del totale ed entrambe relative alla tipologia di emocomponente plasma fresco congelato. La percentuale di richieste e campioni non completi ha evidenziato una situazione non uniforme nei tre Presidi Ospedalieri. A Desenzano la media mensile è risultata del 2,36%, a Manerbio del 1,96%, mentre a Gavardo del 22,4%. Nel complesso gli interventi attuati prima dell'audit (riunioni informative con i Reparti, implementazione di una nuova tipologia di richiesta emocomponenti e aggiornamento della guida ai Reparti), si sono rivelati efficaci per una gestione corretta della richiesta trasfusionale in termini di appropriatezza. Rimangono non omogenei i risultati per quanto riguarda la corretta compilazione della richiesta trasfusionale, con una situazione evidentemente anomala nel Presidio di Gavardo.

Discussione e Conclusioni: dall'analisi dell'audit effettuata è emersa la necessità di un'azione di miglioramento per l'anno 2009 così pianificata: Organizzazione di un corso formativo per referenti trasfusionali di Reparto (medici ed infermieri) allo scopo di consolidare le conoscenze trasfusionali e aumentare la consapevolezza del rischio derivante da una non completa aderenza alle procedure.

SEGNALAZIONI DI INCIDENT REPORTING EFFETTUATE NEL PERIODO DA GENNAIO 2008 A LUGLIO 2009 DALLE U.O AFFERENTI AL DIPARTIMENTO DI MEDICINA DI LABORATORIO DELL'A.O DI DESENZANO DEL GARDA

C-25

G. Cocchi¹, M. Viganò², E. Bernardi¹, D. Dalè¹, L. Manisco², A. Lama², P. Prandini², T. Bettini¹, R. Buniotto², L. Vedovelli¹, C. Mondini¹, B. Milanesi¹

¹Laboratorio di Patologia Clinica A.O Desenzano(BS); ²Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale A.O Desenzano (BS)

Scopo del lavoro: L'Azienda Ospedaliera di Desenzano del Garda, attraverso l'Ufficio Gestione Qualità-Rischio (UGQR), ha implementato dal 2007 una scheda di incident reporting basata sulla segnalazione spontanea di eventi che hanno causato o che potevano causare danno al Paziente o a cose. Il progetto, partito dopo formazione specifica dei Referenti Qualità-Rischio di ciascuna unità operativa, si propone di fornire gli strumenti metodologici necessari per la corretta individuazione, segnalazione, analisi e trattamento del rischio

Materiali e Metodi: Le unità operative afferenti al Dipartimento di Medicina di Laboratorio (Laboratorio di Patologia Clinica, Anatomia Patologica, Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale), hanno segnalato all'UGQR gli eventi, occorsi o potenziali, specificando per ognuno il codice colore, la tipologia e descrizione dell'evento, la presenza o meno di sistemi di controllo, le procedure eventualmente messe in atto. Ogni segnalazione ha dato luogo a un momento di confronto con l'UGQR e, se necessario, con altre unità interessate, per l'analisi dei fattori d'errore e l'implementazione di tempestive azioni correttive e/o preventive in ambito aziendale

Risultati: Nel corso del periodo in oggetto sono stati rilevati e segnalati 17 eventi (12 dai Laboratori di Patologia Clinica, 5 dal SIMT) di cui 7 codici verde, 6 codici giallo e 4 codici rosso. Gli eventi, inseriti nel database dell'UGQR, sono risultati così classificati: 5 (29%) errata identificazione paziente, 4 (23%) mancata identificazione paziente, 3 (18%) errore analisi strumentale, 2 (12%) errata etichettatura campioni, 1 (6%) smarrimento campioni, 1 (6%) potenziale errore diagnostico, 1 (6%) malfunzionamento dispositivo

Discussione e Conclusioni: Nella totalità degli errori intercettati o potenziali le conseguenze sono state annullate grazie all'individuazione precoce e alla buona pianificazione dei controlli e delle procedure adottate. In modo particolare comunque i 3 casi di errata identificazione paziente nell'ambito trasfusionale hanno richiesto l'analisi molto approfondita dei fattori che possono aver indotto l'errore e il confronto con gli operatori di reparto per migliorare la consapevolezza e, di conseguenza, permettere l'innalzamento dei livelli di sicurezza.

UTILIZZO DELLA BALANCED SCORE CARD (BSC) E DELLE ISO15189 NEL DIPARTIMENTO DI MEDICINA DI LABORATORIO DELL'A.O DI DESENZANO DEL GARDA

C-26

B. Milanesi¹, M. Viganò², G. Cocchi¹, E. Bernardi¹, D. Dalè¹, L. Manisco²

¹Laboratorio di Patologia Clinica – Dipartimento Medicina di Laboratorio A.O Desenzano d/G

²SIMT – Dipartimento Medicina di Laboratorio A.O Desenzano d/G

Scopo del lavoro: Gli strumenti da utilizzare per assicurare la Qualità nella Medicina di Laboratorio sono sostanzialmente riconducibili a 3 categorie fondamentali : 1-Contesto organizzativo, 2-Gestione ed esecuzione corretta delle attività, 3- Utilizzo di uno strumento “globale” per monitorare la performance. Il Dipartimento di Medicina di Laboratorio dell’A.O di Desenzano del Garda (U.O Laboratorio di Patologia Clinica, Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Anatomia Patologica), già certificato nelle sue unità componenti secondo la norma di sistema UNI EN ISO 9001:2000, ha ritenuto di disciplinare ciò attraverso un ulteriore supporto fornito dalla norma ISO 15189:2003 e dalla Balanced Score Card (BSC)

Materiali e Metodi: A partire da Giugno 2006 è stato promosso dal Dipartimento un Gruppo di Lavoro multidisciplinare (sino al 2008 limitato al Laboratorio di Patologia Clinica e al SIMT, dal 2009 comprendente anche il Servizio di Anatomia Patologica) che, attraverso un percorso basato su riunioni periodiche, formazione e aggiornamento finalizzato all’obiettivo, incontri anche con docenti/consulenti esterni, coinvolgimento all’attività di tutto il personale, ha consentito il raggiungimento degli obiettivi in 2 fasi successive

Risultati:

- FASE 1 : raggiunta a Dicembre 2006 ha portato alla creazione e all’implementazione della BSC del Dipartimento articolata in 4 Aree (Formazione, Processi, Economica, Soddisfazione Cliente)
- FASE 2: raggiunta a Dicembre 2007, riconfermata a Marzo 2008, ha portato al conseguimento e al mantenimento della conformità alla norma ISO 15189:2003 per le attività dei Laboratori di Patologia Clinica e Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale

Discussione e Conclusioni: Attraverso i 2 strumenti BSC e ISO 15189 e al loro continuo monitoraggio, è stato raggiunto un livello ottimale di gestione in Qualità dei Laboratori e degli aspetti peculiari del loro funzionamento. E’ stato inoltre implementato grazie ad essi un adeguato sistema di riconoscimento dei risultati critici e un idoneo ed efficace sistema di comunicazione precisa e tempestiva del risultato.

MISURARE LA QUALITA’ DELLE PRESTAZIONI NELLE TERAPIE ANTICOAGULANTI

C-27

G. Saccani, D. Piccoli, M. Vantini, S. Gaino, M. Caputo

Laboratorio Analisi Cliniche e Microbiologia, AUSL22 Veneto, Bussolengo (VR)

Scopo: Esprimere l’attività del nostro Centro per la sorveglianza della terapia anticoagulante orale sotto forma di standard di prodotto. Definire uno standard di prodotto rappresenta la premessa su cui fondare le azioni per il miglioramento continuo della qualità.

Metodi: Utilizzando il software gestionale-PARMA (Programma per l’Archiviazione, Refertazione e il Monitoraggio dei pazienti Anticoagulanti, IL, Milano), che estrae ed elabora automaticamente i dati di attività, sono state analizzate le prestazioni a cadenza semestrale, a partire da gennaio 2008. Sono stati definiti alcuni indicatori, per ognuno dei quali è stato indicato un livello standard, cioè un valore soglia assunto o auspicato da raggiungere per considerare soddisfacente la prestazione. La qualità media periodica considera il n° medio controlli/mese (standard <3), l’intervallo tra le visite (standard >15 giorni) e la percentuale di pazienti con INR in range terapeutico (standard >50%) e la percentuale di pazienti al di fuori dell’intervallo. Il tempo trascorso in range: calcola la percentuale di giorni in cui i pazienti rimangono all’interno del range prefissato per quella determinata indicazione terapeutica (standard 65%).

Risultati: I dati rilevati sono rimasti all’interno di quanto ci eravamo prefissati; in particolare la media dei controlli/mese è stata: 1.7 (contro una soglia di <3); l’intervallo tra le visite è stato di 17.7 giorni (soglia >15) e la percentuale di pazienti con INR in range è stata 56.4% (soglia >50%). Infine per il tempo trascorso in range la percentuale di pazienti trovata è stata 68,3% (soglia >65%).

Conclusioni: La nostra Azienda ha varato da alcuni anni un Sistema di Gestione Integrato della Qualità che ha portato alla certificazione dell’intera struttura sanitaria nel giro di 24 mesi. All’interno del Sistema l’elaborazione di standard di prodotto si è rivelata unno strumento utile per monitorare in termini qualitativi le prestazioni rispetto ad un livello atteso. Il Servizio di Laboratorio ha applicato in passato questo strumento per valutare l’efficacia del contributo della Microbiologia alla diagnostica delle sepsi. Lo stesso principio ci ha spinto a trasferire questo elemento nel campo del monitoraggio TAO che, per l’importanza dell’argomento e per il notevole impatto sociale si presta bene a questo tipo di valutazioni. Infine non è affatto trascurabile l’aspetto educativo e formativo che questo approccio è in grado di stimolare in tutto il personale coinvolto.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA TAT OUTLIERS**C-28****M. Morandini, P. Cappelletti**

Patologia Clinica, DML, AOSMA, Pordenone

Scopo del lavoro. Valutare l'osservanza dei TAT concordati (<1h) di test pivot (HGB, glucosio, potassio, cTnI) provenienti dal Pronto Soccorso (PS); mappare il rischio e valutare l'impatto di un TAT lungo (>2h) sull'outcome del paziente.

Materiali e metodi. I TAT (analitico, preanalitico e postanalitico) di 5000 pazienti sono stati raccolti retrospettivamente e le cause dei ritardi sono state analizzate con Root Cause Analysis (RCA). Di 245 pazienti consecutivi sono stati raccolti anche i dati clinici per la mappare il rischio del paziente legato ai ritardi di TAT. Tramite questionario ai professionisti (14 medici, 32 infermieri) del PS è stata valutato il rischio indotto da un ritardato TAT (>2 h).

Risultati. Il 90° pc del TAT è 43 min per HGB, 70 per glucosio, 67 per K, 79 per cTnI. Le medie e mediane dei TAT mensili sono: preanalitico 30 e 27 min; analitico del primo risultato 27 e 13; analitico del profilo completo 49 e 38; postanalitico 125 e 46; Vein-to-brain 146 e 80. La RCA ha evidenziato outlier in Drawn-to-Receive per inserimento dati anagrafici incompleti in CPOE, raccolta del campione, trasporto campioni in Laboratorio; in Receipt-to-Report per tempi differenti nel trattamento campioni e analisi, verifica e disponibilità risultati (risultati anomali: inadeguatezza campione, risultati critici/anomali, approfondimenti, ripetizioni); in Result-to-brain per ritardo da problemi organizzativi al cambio turno/mattino del personale. La mappatura del rischio ha mostrato correlazione tra l'attenzione del personale PS e il rischio del paziente. Il questionario ha mostrato che i profili richiesti e gli esami di imaging sono in rapporto con i codice colore; le consulenze sono richieste per pazienti complessi secondo protocollo definito oppure per finalità di rule out. Secondo i rispondenti al questionario, un ritardo >2h può produrre conseguenze gravi in 14 situazioni cliniche suggerite, ma non ha un identico impatto in altre 13 situazioni proposte. Nell'8% dei casi non sono disponibili tutti i risultati dei test richiesti nei tempi attesi.

Discussione e conclusioni. Il TAT preanalitico, in particolare quello del trasporto in laboratorio, è il fattore predominante degli outliers e le azioni correttive valutate sono state inserimento di POCT; trasporto meccanico dei campioni; comunicazione al laboratorio del codice colore del paziente. La rilevazione cadenzata dei TAT, il monitoraggio e l'analisi delle cause degli outliers e la discussione dei risultati dell'indagine e delle possibili soluzioni con i "clienti" del PS sono apparsi strumenti potenti di conoscenza reciproca e opportunità reali di miglioramento dei percorsi diagnostico-terapeutici del paziente critico. Il monitoraggio del TAT assume, quindi, valore come controllo del total testing process, ma come indicatore della qualità della comunicazione e controllo del rischio.

POCT: PROPOSTA DI ALLINEAMENTO DELLA RETE DI EMOGASANALIZZATORI DEGLI OSPEDALI RIUNITI DI TRIESTE**C-29****B. Casolari, E. Stenner, M. Canaletti, B. Biasioli**

Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliero Universitaria, Ospedali Riuniti di Trieste

Scopo del lavoro. Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente utilizzo negli ospedali di sistemi POCT, ovvero "di dosaggi eseguiti al letto del paziente o vicino al luogo di degenza il cui esito porti alla possibilità di incidere sulle decisioni cliniche". Le norme UNI EN ISO 9000/ ISO 15189/2003 e ISO 22870/2006 e CLSI POCT4-A2, regolamentano anche i POCT e definiscono che al laboratorio clinico spetta la responsabilità della qualità e della governance clinica. Sebbene il sistema di qualità applicato ai POCT è ormai ben definito, poche sono le evidenze pratico/organizzative per l'allineamento strumentale al fine di creare una rete affidabile, capace di garantire unicità di informazione clinica. Lo scopo di questo lavoro è di proporre un protocollo operativo di allineamento.

Materiali e metodi. Nel periodo marzo-agosto 2009 sono stati eseguiti settimanalmente dal personale delle rispettive strutture (10) i controlli di qualità su 3 livelli sia sull'EGA in dotazione che su quello presente in laboratorio per verificare l'accuratezza del dato rispetto al POCT di riferimento del laboratorio e l'allineamento tra tutti i POCT della rete. L'analisi dei dati prevedeva da un lato il calcolo del bias% rispetto al POCT laboratorio, dall'altro il calcolo dell'imprecisione in percentuale del POCT reparto in relazione al gruppo ($CVI = CV \text{ EGA reparto} / CV \text{ EGA gruppo}$) e dell'imprecisione del POCT reparto in relazione al gruppo omogeneo in unità di deviazione standard ($SDI = (media \text{ POCT reparto} - media \text{ gruppo}) / SD \text{ gruppo}$). Ove necessario sono stati richiesti interventi di manutenzione straordinaria. Successivamente, l'analisi dei risultati è stata divulgata alle unità operative con AUDIT periodici.

Risultati. Su 10 EGA presenti nelle unità operative, 6 hanno evidenziato un bias < al 5% su tutti i parametri misurati, 2 un bias < al 10% mentre negli altri 2 reparti si sono verificati alcuni problemi a carico del pO₂ e /o pCO₂; il pH, invece, è risultato sempre con bias < al 5%. Il CVI e SDI sono risultati entrambi ottimi nel 70% dei reparti, nel 20% il CVI era ottimo e l'SDI buono, mentre nel 10% la prestazione è risultata insufficiente.

Discussione e conclusioni. Con il protocollo operativo proposto, è possibile da un lato controllare il bias% dei POCT di reparto rispetto a quello di laboratorio e ove necessario, richiedere interventi tecnici, dall'altro di verificare l'intercambiabilità degli strumenti, così da permettere, in caso vi sia un fermo strumentale, di effettuare le analisi in uno qualsiasi degli altri strumenti della rete.

ASSOCIAZIONE TRA UREAPLASMA UREALYTICUM ED ALTRI MICRORGANISMI NEL SECRETO VAGINALE

D-01

C. Mazzone, M. Laneve

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, P. O. Occidentale (Mottola), AUSL TA

Scopo del lavoro: Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'associazione tra l'Ureaplasma urealyticum e altri microrganismi patogeni e non, presenti nel secreto vaginale. I Micoplasmi sono batteri appartenenti alla famiglia Mycoplasmataceae, ubiquitari, con metabolismo anaerobio, alcuni responsabili di Infezioni umane. Tra le specie che colonizzano il tratto urogenitale, vi sono Ureaplasma (U) urealyticum e Mycoplasma (M) hominis. L'assenza di una parete cellulare conferisce loro la capacità di resistenza agli antibiotici beta-lattamici che inibiscono la sintesi di questa struttura cellulare. Sono responsabili di varie patologie sia nei soggetti di sesso femminile (cervicovaginite, salpingite) che in quelli di sesso maschile (uretrite, epididimite).

Materiali e Metodi: Nel periodo compreso tra maggio 2008 – maggio 2009, è stata condotta l'indagine sui tamponi cervico-vaginali di 190 pazienti pervenute al nostro Laboratorio, come ricoverate e ambulatoriali esterne. La Diagnostica dei Micoplasmi urogenitali è stata ottenuta mediante l'utilizzo di un Kit Mycoplasma IST 2, (BioMérieux) il quale permette di eseguire contemporaneamente, la coltura, l'identificazione, la conta indicativa ($\geq 10^{-4}$ UFC soglia fissata per definire patogeno) e la sensibilità agli antibiotici. L'isolamento delle colonie batteriche è stato effettuato mediante semina dei tamponi sui seguenti terreni di coltura solidi (BioMérieux): Agar(A.) sangue CNA (per la ricerca degli Streptococchi e batteri Gram+ in generale), A. MSA 2 (per la ricerca degli Stafilococchi), A. Mac Conkey (per la ricerca di Enterobatteri), A. Sabouraud (per i miceti), A. CAN 2 (selettivo per Candida Albicans), A. GAR 2 (per la ricerca della Gardnerella vaginalis).

Risultati: Dei 190 tamponi esaminati, 80 (42%) sono risultati positivi per U. urealyticum, 10 (5%) positive per M. hominis e in 2 casi sono stati identificati entrambi. L'U. urealyticum in 25 casi è stato reperito in associazione a Lactobacillus spp, in 21 casi con C. albicans, 10 con E. coli, 6 con G. vaginalis, 4 con G. agalactie, 3 con E. faecalis, 3 con K. Pneumoniae, 1 con P. mirabilis, 1 con Enterobacter spp. Poco rilevanti sono i dati riguardo al M. hominis, associato solo in 2 casi al Lactobacillus spp.

Conclusioni: I dati di questo studio mostrano che nel 31% dei casi l'U. urealyticum è associato al Lactobacillus spp., condizione quindi definita fisiologica, mentre nel 26% dei casi è associato alla C. albicans, la quale sebbene fa parte della normale "flora" vaginale, è responsabile delle più comuni vaginiti. In maniera più esigua si susseguono le altre specie batteriche. I risultati di questo lavoro confermano l'utilità del Laboratorio di Patologia Clinica nella sorveglianza delle Infezioni genitali da Micoplasmi.

IL LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA NELLA DIAGNOSI NON INVASIVA DELL'INFEZIONE DA HELICOBACTER PYLORI

D-02

C. Mazzone, M. Laneve

Laboratorio di Patologia Clinica del Presidio Ospedaliero Occidentale (Mottola) A.USL Taranto

Scopo del lavoro: Obiettivo del nostro lavoro è stato valutare la frequenza, nella popolazione della zona Occidentale della provincia di Taranto, dell'infezione sostenuta da Helicobacter Pylori (H.P.) e mettere in risalto la differenza di richieste mediche relative agli anti-H.P. (Ig) nel siero e dell' Antigene (Ag) nelle feci. L'H.P. è un batterio Gram negativo a forma di spirale, microaerofilo, specializzato a vivere in un unico ambiente, lo stomaco umano. I determinanti di patogenicità presenti in tutti i ceppi di H.P consentono al microrganismo di colonizzare e di aderire all'epitelio gastrico. Tra questi i flagelli che conferiscono al batterio una vivace motilità, la produzione di ureasi che tampona l'acidità gastrica e le strutture di adesione. E' coinvolto nella patogenesi dell'ulcera peptica, duodenale e gastrica, del carcinoma e del linfoma gastrico. La trasmissione del batterio sembra avvenire da persona a persona attraverso la via oro-orale e oro-fecale.

Materiali e metodi: Il nostro studio è stato effettuato da giugno 2008-giugno 2009, presso il nostro laboratorio di Patologia Clinica. L'indagine è stata condotta su pazienti (pz) pervenuti come ricoverati e ambulatoriali esterni. Per il dosaggio delle Ig nel siero, abbiamo usato l'analizzatore VIDAS (BioMérieux), metodo ELFA (Enzyme Lynked Fluorescent Assay), mentre per il dosaggio dell' Ag nelle feci, un test manuale immunocromatografico (H.PYLORANTIGEN MERIDIAN).

Risultati: Abbiamo esaminato 30 pz per il dosaggio delle Ig nel siero, di cui 8 (26,5%) sono risultati positivi, e 148 pz per il dosaggio dell' Ag nelle feci, di cui 35 (23%) sono risultati positivi.

Si è dimostrata una relativa differenza di positività maggiore nel sesso maschile (5%) in entrambi le ricerche.

Conclusioni: Dai dati raccolti si evince che nella nostra realtà locale l'incidenza dell'infezione da H.P. è pari al 24% sul totale di 178 campioni esaminati. Risulta evidente come il numero delle richieste mediche relative alla ricerca degli anticorpi (30) pari al 17%, sia ulteriormente ridotta rispetto a quella degli antigeni (148) pari all'83%, dal momento che la presenza delle Ig nel siero non è indicativa di una infezione pregressa o in atto, pertanto questi risultati dimostrano come ormai tale metodica sia superata. Si sottolinea l'importanza del laboratorio di Patologia Clinica nella diagnosi non invasiva dell'infezione da H.P. e nella valutazione dell'efficacia della terapia antibiotica finalizzata all'eradicazione dell'H.P.

ANTIBIOTICO-RESISTENZA NELLE INFEZIONI DA MICOPLASMI DEL TRATTO UROGENITALE

D-03

M. Laneve, M.G. Tinelli, B. Grossi

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia P. O. Occidentale (Mottola-TA) AUSL TA

Scopo del lavoro: I Mycoplasmi (Mycopl.) sono microrganismi caratterizzati dall'assenza di una parete rigida, resistenza a molti antibiotici (antib.), come i beta-lattamici, che agiscono sulla sintesi della parete e grande plasticità cellulare. Le specie che colonizzano il tratto urogenitale sono l'Ureaplasma (Ureapl.) urealyticum (u.) e il Mycopl. hominis (h.), responsabili di infezioni ginecologiche, malattia infiammatoria pelvica e patologie della riproduzione. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la resistenza dei Mycopl. urogenitali agli antib. di più comune impiego, nella popolazione di sesso femminile della zona Occidentale della provincia di Taranto.

Materiali e Metodi: L'indagine è stata condotta su tamponi endocervicali di 250 pazienti, ricoverate e ambulatoriali esterne, di età compresa tra i 18 e 35 anni, nel periodo Maggio 2008 e Maggio 2009. Nel nostro studio abbiamo utilizzato il kit Mycoplasma IST 2 (BioMerieux), che permette di effettuare la coltura, l'identificazione, la quantificazione della carica batterica e la determinazione della sensibilità agli antibiotici per Ureapl. u. e Mycopl. h. Sono stati saggiati i seguenti antib.: Josamicina (JOS), Eritromicina (ERY), Azitromicina (AZI), Claritromicina (CLA), Doxiciclina (DOT), Tetraciclina (TET), Ofloxacina (OFL), Ciprofloxacina (CIP), Pristinamicina (PRI).

Risultati: Dei 250 tamponi cervicali analizzati sono risultati positivi 120 campioni (48% del totale); l'Ureapl. u. è stato isolato in 96 casi (80%) contro i 24 di Mycopl. h. (18%). In 2 casi sono stati identificati sia l'Ureapl. u. che il Mycopl. h. (2%). L'Ureapl. u. ha mostrato, nei confronti degli antib. saggiati, le seguenti percentuali di sensibilità: DOT 100%, JOS 90%, OFL 40%, ERY 35%, TET 99%, PRI 99%, AZI 45%, CIP 18%, CLA 89%. I valori di sensibilità del Mycopl. h. osservati sono stati: DOT 100%, JOS 69%, OFL 45%, ERY 2%, TET 90%, PRI 97%, AZI 30%, CIP 9%, CLA 44%.

Discussione e Conclusioni: I risultati ottenuti sottolineano che, il largo e spesso indiscriminato impiego degli antib. di uso comune, ha determinato un notevole incremento della antibiotico-resistenza dei Mycopl. La sensibilità agli antib. non mostra apprezzabili differenze nelle due popolazioni microbiche esaminate se non per quanto riguarda ERY e CLA, mentre DOT, PRI, e TET sono risultati essere i farmaci con le percentuali più elevate di sensibilità. I Mycopl. si sono rivelati più resistenti nei confronti di CIP e ERY ed in particolare il Mycopl. h. La nostra indagine evidenzia che le tetracicline, controindicate in gravidanza e in età pediatrica, sono ancora i farmaci di prima scelta e che il Laboratorio di Patologia Clinica continua a ricoprire un'importanza strategica nel monitoraggio del crescente fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

INCIDENZA DELLE INFEZIONI GENITALI FEMMINILI DA MICOPLASMI

D-04

M.G. Tinelli, M. Laneve, B. Grossi

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia P.O. Occidentale (Mottola-TA) ASL TA

Scopo del lavoro: I Mycoplasmi (Mycopl.) sono microrganismi inclusi nella classe dei Mollicutes, che comprende la famiglia Mycoplasmataceae a cui appartengono due generi responsabili di infezioni del tratto urogenitale: Ureaplasma (Ureapl.) urealyticum (u.) e Mycopl. Hominis (h.). Essi non possiedono una parete cellulare e ciò conferisce loro la capacità di assumere forme diverse e la resistenza agli antibiotici beta-lattamici che inibiscono la sintesi di tale parete. Sono responsabili di cervico-vaginite e salpingite nel sesso femminile e uretrite ed epididimite nel sesso maschile. I Micopl. sono associati spesso ad infertilità sia maschile che femminile, ad aborto spontaneo o rottura precoce delle membrane in corso di gravidanza con conseguente corionamnionite. Nel nostro lavoro abbiamo valutato l'incidenza delle infezioni da Ureapl. u. e Mycopl. h. nella popolazione dell'area occidentale della provincia di Taranto e la distribuzione dei casi positivi in relazione all'età delle donne studiate.

Materiali e Metodi: Nel periodo compreso tra Maggio 2008 e Maggio 2009, presso il Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia del P.O. Occidentale (Mottola) della ASL TA, sono stati isolati ceppi di Ureapl. u. e Mycopl. h., provenienti da tamponi endocervicali. L'indagine è stata condotta su pazienti pervenute al nostro Laboratorio come ricoverate e ambulatoriali esterne. La Diagnostica dei Mycopl. urogenitali è stata ottenuta mediante l'utilizzo del kit Mycoplasma IST 2 (BioMerieux), che permette di eseguire contemporaneamente, la coltura, l'identificazione, la conta indicativa (≥ 10000 UFC soglia fissata per definire patogeno) e la determinazione della sensibilità nei confronti di 9 antibiotici. La selettività nei confronti della flora di contaminazione eventualmente presente nel prelievo è ottenuta dalla associazione di 3 antibiotici e di un antifungino.

Risultati: Nel corso delle analisi svolte sono stati esaminati 250 pazienti: 130 (52%) sono risultate negative, 96 (38%) sono risultate positive all'Ureapl. u. e 24 (7%) positive per Mycopl. h. L'82% erano donne di età compresa tra i 18 e 35 anni, cioè donne in età fertile, probabilmente perché in questa fascia di età sono più possibili le gravidanze e i controlli ginecologici corrispondenti.

Discussione e conclusioni: L'Ureapl. u. è risultato il Mycopl. più frequentemente isolato sui campioni positivi, pari al 38% del totale e specialmente in donne molto giovani. Verosimilmente le cause sono attribuibili alle errate abitudini sessuali: numero dei partners, promiscuità, scarsa conoscenza delle modalità di contagio. Il Laboratorio di Patologia Clinica conserva un ruolo primario nella sorveglianza delle infezioni da Mycopl., un patogeno ancora responsabile di patologie dalle complicanze spesso gravi.

MICROORGANISMI GRAM NEGATIVI PRODUTTORI DI BIOFILM ISOLATI DA CATETERI VESCICALI PERMANENTI DI PAZIENTI ANZIANI

D-05

M.A. Burgio¹, S. Frugoni², A. Anicito², A. Berlusconi², L. Tagliabue³, P. Landini³

¹MultiLab, Multimedica Holding, Milano; ²A.S.P. I.M.M.e S. e P.A.T., Servizio di Medicina di Laboratorio, Milano; ³Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano

Introduzione: in natura le cellule batteriche possono esistere come cellule singole (placton), o come biofilm. Il biofilm rappresenta un sistema biologico con un alto livello di organizzazione, dove i batteri sono adesi ad una superficie e strutturati in comunità funzionali. I batteri che vivono su un biofilm hanno proprietà differenti dalla controparte planctonica per un diverso pattern di espressione genica e per una maggiore resistenza agli antibiotici. In ambienti ospedalieri i biofilm possono essere causa di infezioni persistenti, favorita dallo stato di immunocompromissione del paziente e da una precedente infezione o esposizione all'antibiotico. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la capacità dei microrganismi gram negativi isolati da cateteri vescicali permanenti di produrre biofilm.

Materiali e metodi: Sono stati esaminati 150 campioni di urine di pazienti portatori di catetere vescicale permanente ricoverati presso A.S.P Pio Albergo Trivulzio. Per i saggi di adesione sono stati utilizzati terreno LB diluito 1:4 e colorazione con cristalvioletto.

Risultati: Sono risultati positivi alla presenza di microrganismi 96 (64%) campioni, negativi 30 (20%), contaminati (campioni con più di 2 microrganismi isolati) 24 (16%). 85 (88%) degli isolati erano costituiti da microrganismi gram negativi:

M.morganii (1%), *K.oxytica* (1%), *E.cloacae* (1%), *E.aerogenes* (1%), *C.freundii* (1%), *P.stuartii* (2%), *K.pneumoniae* (5%), *P.aeruginosa* (13%), *P.mirabilis* (16%), *E.coli* (48%). Dai saggi di adesione si evidenzia che tutti i ceppi di *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *E.cloacae* e *C.freundii* isolati producevano biofilm. Nei ceppi di *E.aerogenes* e *M.morganii* non si è osservata alcuna produzione di biofilm. Il 26% dei ceppi di *E.coli* è risultato produttore di biofilm, così come il 93% di *P.mirabilis* e il 50% di *P.stuartii*. Complessivamente il 55% dei microrganismi gram negativi isolati è risultato in grado di produrre biofilm.

Conclusioni: L'alta percentuale di batteri in grado di formare biofilm pone, in questo tipo di pazienti, il problema di una terapia diversa da schemi terapeutici convenzionali

PARTO PRETERMINE E POSITIVITA' DA STREPTOCOCCO β GALACTIAE STUDIO EPIDEMIOLOGICO NELL'A.O. SAN CARLO DI POTENZA

D-06

R. Beneventi, A. Siciliano, M. Mancino

A.O.S. Carlo, U.O.S. Lab. Urgenza, U.O.S. Microbiologia, Potenza

Introduzione: Lo Streptococco β galactiae (SBG) presente nelle vie genitali e nell'ultima parte del tratto gastrointestinale, nella donna può produrre infezioni: fattori favorenti sono intensa attività sessuale, dispositivi anticoncezionali intrauterini, giovane età. In gravidanza può causare malattia puerperale (febbre, infezioni urinarie, parto pretermine, rottura delle membrane amniocoriali). Nel neonato può provocare la E.O.D. e L.O.D.

Scopo del lavoro: Identificare mediante uno studio epidemiologico retrospettivo: l'incidenza della positività da SBG in gravidanza e la frequenza con cui è responsabile di parto prematuro e/ di rotture amniocoriali.

Materiali e Metodi: Per la ricerca di SBG in gravidanza, sono state seguite le raccomandazioni dettate dal centro per malattia controllo e prevenzione: coltura in Agar Sangue Columbia -Camp test. Sono stati esaminati 1948 tamponi vagino-rettali, prelevati in gestanti, afferenti all'Ambulatorio di Ostetricia nel biennio 2006-08 e processati presso l' U.O.S. di Microbiologia.

Discussione: Nei soggetti screenati l'età numericamente più significativa è di 32 anni (160casi). Per fasce di età il maggior numero di esami effettuati, si è riscontrato fra 31-40 anni 55% (1088 su 1948: con 25% di positivi). L'andamento annuale ha evidenziato due picchi uno a Dicembre 2007 con 54 casi: 32 negativi e 22 positivi (40,7%) ed uno a Settembre 2006: 69 casi, 48 negativi e 21 positivi (30,4%). Per la provenienza sono stati condotti due diversi studi: italiana o straniera e intra-regionale. Le donne straniere screenate hanno un'età media di 29,9 anni < ai 31,5 con una positività del 20,5% contro il 25% delle italiane. I soggetti esaminati risultano provenienti da 78 paesi: 11 in provincia di Matera e 67 in quella di Potenza. 736 soggetti provengono da Potenza, 537 negativi e 199 positivi (27%); 115 dal comune di Avigliano (PZ) : 84 negativi e 31 positivi (27%). Età media: 32,3 a Potenza e 31,9 ad Avigliano. Dei 14 casi extraregionali 13 sono negativi e 1 positivo (7,1 %). Dei 166 soggetti di provenienza ignota: 30 sono risultati positivi (18,1%). Di 111 tamponi vaginali negativi: il 23% ha presentato rottura di membrane, contro il 32% dei 28 soggetti positivi. Il peso del neonato: nei soggetti positivi per SBG, nel 10,7% è stato inferiore a 2500gr, mentre non si sono riscontrate nascite pre-termine.

Conclusioni: I dati emersi dal presente lavoro, hanno evidenziato degli aspetti significativi: l'elevata percentuale di positivi (24,8%) mostra che 1 donna su 4 è colonizzata da SBG, la % di positività all'SBG (20%) nelle straniere è significativa, l'incidenza di positività nella città di Potenza (27%), la frequenza elevata di rottura di membrane in soggetti positivi (32% contro il 23%).

FASCITE NECROTIZZANTE DA LA-MRSA ST398 IN PAZIENTE LAVORATORE AGRICOLO IN UN ALLEVAMENTO DI BOVINI

D-07

M. Pedroni¹, A. Bonomini¹, L. Zanetti², B. Antonini³, A. Pantosti⁴, M. Monaco⁴, L. Soavi⁵, B. Milanese¹

¹Laboratorio, ²ORL, ³T.I. - Manerbio BS, A.O.D.; ⁴ISS Roma; ⁵Infettivi, A.O. Sp. Civili BS

Scopo del lavoro: si è voluto dimostrare come *Staphylococcus aureus*, che colonizza l'uomo (naso, gola, perineo, ecc.) e dagli anni '90, è diventato un grave problema per le infezioni ospedaliere, MRSA, è presente anche negli allevamenti di animali da reddito e costituisce una nuova ed importante fonte di MRSA (1). MRSA diverso da quello riscontrato, in questi ultimi anni, in infezioni di persone che non avevano mai avuto contatti con gli Ospedali e classificato come comunitario, CA-MRSA. Questi MRSA sono caratterizzati dal non essere tipizzati attraverso PFGE dopo digestione del DNA con SmaI, tipizzabili tramite spa type, classificati come ST 398 con la MLST. In Italia sono riportati rarissimi casi di infezione invasiva negli uomini (2).

Materiali e Metodi: un paziente di 52 anni, italiano, lavoratore agricolo, diabetico non noto, obeso, il 28 Aprile 2008 veniva ricoverato in ORL, con febbre, insufficienza respiratoria per ascesso laterocervicale dx, con fascite necrotizzante. Sottoposto ad evacuazione dell'ascesso e tracheostomizzato, viene ricoverato nel Reparto di Terapia Intensiva per il monitoraggio e le cure post operatorie. Conteggio dei GB 29.000, il resto degli esami nella norma. Terapia antibiotica empirica con Targosid, Deflamon, Imipenem. Dagli esami colturali viene isolato un MRSA dall'emocoltura e dal pus. Si mantiene solo Targosid e Dalacin per 4 gg, sostituiti con Linezolid dopo consulenza infettivologica. In settima giornata viene riportato in ORL da dove viene dimesso completamente ristabilito.

Risultati: il ceppo isolato è risultato resistente alla Meticillina, ma sensibile a tutti gli antibiotici non beta-lattamici, tranne la Tetraciclina: questo aspetto associato alla mancanza di contatti del paziente con strutture sanitarie negli anni precedenti ha fatto sospettare un CA-MRSA, pertanto veniva inviato all'ISS per una tipizzazione completa. La tipizzazione del ceppo ha dato i seguenti risultati: SCCmec V, Leucocidina di Panton-Valentine negativa, non tipizzabile attraverso PFGE, identificato tramite spa type come t899. Questi dati non concordano con un CA-MRSA ma con un LA-MRSA (Livestock-Associated) in quanto t899 è tipico del clone ST398 dei suini (1).

Conclusioni: la particolare virulenza di questo ceppo, pone una preoccupazione aggiuntiva per l'impatto sulla salute pubblica di MRSA associati con gli animali e richiede una particolare attenzione, da parte dei Microbiologi, per differenziare gli MRSA, Ospedalieri, Comunitari, Animali.

Bibliografia

1)Wulf M.; Prevalence of MRSA among veterinarians: an international study. Clin Microb Inf 2008;14: 29-34

2)Pan A. ed altri; Community-acquired MRSA ST398 Infection, Italy. Emerg Inf Dis 2009; 15: 845-846

RARO CASO DI TUBERCOLOSI PARAVERTEBRALE IN ADOLESCENTE

D-08

C. Carmignani¹, P. Mengalli², G. Bergamaschi³, A. Corti³, B. Milanese¹

¹Patologia Clinica, ²Diagnostica per immagini, ³Pediatria, Az. Ospedaliera Desenzano d/G

Scopo del lavoro: Caso di tubercolosi paravertebrale in una pz dodicenne. La particolarità è data dal fatto che lo studio della patogenesi non ha evidenziato fonti primarie polmonari di TBC. Il lavoro è quindi volto a capire le dinamiche di propagazione del patogeno e la sua eziopatogenesi per giungere ad adeguata terapia chemioterapica.

Materiali e Metodi: Esami ematochimici: emocromo, VES, PCR; esami sierologici per HIV, HBV, HCV, Morbillo, Toxo. Esami di diagnostica per immagini: Rx Bacino e addome, eco addome, cute/sottocute, TC ed RM smc rachide lombare. Esame colturale da agoaspirato raccolto liquido, urine e succo gastrico. Il liquido da ascesso è stato seminato in piastre per libera crescita e selettive (Agar ciccolato, sangue, CNA, Mc Conkey) in incubazione a 37°C ed in terreni selettivi per la crescita di bacilli tubercolari (terreno liquido MGIT e terreno solido Lowestein Yessen) in atmosfera modificata del 5% di CO₂. Su succo gastrico e urine è stata eseguita la ricerca di bacilli tubercolari. Atb del micob. isolato presso centro di riferimento.

Risultati: Dodicenne, sesso F, origine Nigeriana. Al primo ricovero manifestava anemia (emoglobina 7.9g/dL), leucocitosi (19.000/microlitro) con formula normale, piastrinosi (972mila/microlitro), PCR aumentata (3,54 mg/dL) e dolori articolari. Sierologia negativa. Anamnesi negativa per problemi respiratori. Durante il ricovero dolore anca Dx e febricola. La diagnostica per immagini non riveleva nulla di particolare. Si procede con terapia antibiotica e studio della forma anemica. Dimessa. Persistono i dolori articolari, due mesi dopo si rileva tumefazione in sede paravertebrale dx, eco rivela due raccolte di liquido corpuscolato interconnesse tra di loro ed una terza, nella regione glutea omolaterale, TC evidenzia erosione corticale a contatto con il sacro che interessa la metà inferiore di S1 e tutto S2, linfonodi ingranditi in sede paraaortica e lungo il decorso dei vasi iliaci. Aspirati 10 cc di liquido purulento dalla raccolta, esame colturale si rivela positivo per *Mycobacterium tub.* Ricerca di micob. da succo gastrico e campioni ripetuti di urine sempre negativa. RX torace e spirometria non presentano nulla di significativo. Eseguita Mantoux ai genitori e al fratello che risultavano tutti positivi. RM conferma diagnosi di morbo di Pot.

Discussione/Conclusioni: Allo stato delle cose non è possibile escludere totalmente l'assenza di sede primaria di propagazione stante le difficoltà linguistiche della famiglia che non permettono la ricostruzione della storia clinica della pz, l'assenza di segni clinici specifici depone a favore, il caso è comunque degno di attenzione dato l'aumento del tasso di incidenza delle TBC primarie in Europa.

BACTEREMIA DUE TO OCHROBACTRUM ANTHROPI: AN EMERGING NOSOCOMIAL PATHOGEN. A REPORT OF TWO CASES

D-09

F. Pistola¹, L. Puzzolante¹, G. Mazzanti¹, F. Piuze¹, B. Branca², E. Fumo², V. Moretti², M. Ruscio¹

¹SOC di Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, ²SOC di Medicina Generale, P.O. "S.ANTONIO", ASS4, San Daniele del Friuli (UD)

Introduction. Ochrobactrum anthropi is increasingly recognized as an emerging opportunist human pathogen. Ochrobactrum anthropi, formerly known as CDC group Vd or Achromobacter species, is a Gram-negative, non-lactose-fermenting, motile by peritrichous flagella, aerobic bacillus that is oxidase- and urease-positive. The organism is widely distributed in the environment and water sources. O. anthropi is not an inherently virulent pathogen, but its ability to colonise surfaces of medical devices and hospital water sources makes it a ready coloniser of hospitalised patients. O. anthropi can cause bloodstream infections with considerable morbidity in immunocompromised hosts. Management of infection is hampered by high-level intrinsic resistance to many antibiotic classes.

Aim of the study. We describe two case reports of nosocomial Ochrobactrum anthropi bacteremia in immunocompromised patients.

Material and methods. All blood cultures incubated in aerobic bottles (BacT/Alert system; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) yielded a gram-negative bacillus. Colonies were obtained on blood Columbia agar and MacConkey agar (BioMérieux) after 24h of incubation in air at 37°C. Colonies about 1 mm in diameter, circular, low convex, smooth, shining, nonhaemolytic and having entire margins grew on blood Columbia agar. Mucoid, non-lactose fermenting colonies were found on MacConkey agar. Cell morphology was observed by light microscopy after Gram staining. Organisms were identified as *Ochrobactrum anthropi* by use of systems ATB™ Expression (ID 32 GN strip version) and VITEK 2 (GN card version) (BioMérieux).

Results. All O. anthropi isolates tested were resistant to β -lactams, particularly broad-spectrum cephalosporins and broad-spectrum penicillins, and all were susceptible to gentamicin, ciprofloxacin, imipenem and trimethoprim-sulfamethoxazole. Susceptibility testing was performed by the Kirby-Bauer disk diffusion method using Mueller-Hinton agar (BioMérieux) and commercially available antibiotic disks.

Discussion and conclusions. Prevention of O. anthropi infection depends upon the application of modern infection-control practises, with emphasis on the control of hospital and environmental reservoirs.

SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI DA ACINETOBACTER DISTRIBUZIONE DEI CEPPI E PATTERNS DI SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI

D-10

C. Crociani, M. Liguori, M.P. Mastio, M. Di Rosa, D. Salici, L. Murgia, C. Giannetti, F. Satta, M. Angius

Medicina di Laboratorio Dipartimento dei Servizi Speciali di Diagnosi e Cura - Azienda Ospedaliera "G. Brotzu" - Cagliari

Scopo dello studio: Nel corso di questi ultimi anni, le infezioni nosocomiali da acinetobacter sono aumentate, diventando di difficile gestione per il fenomeno della multi drugs resistance. L'introduzione degli antibiotici a largo spettro ha probabilmente giocato un ruolo importante in questo processo. Pertanto abbiamo ritenuto opportuno studiare l'epidemiologia delle infezioni da acinetobacter in termini di:

1. Incidenza complessiva e nelle varie aree di ricovero (Medica, chirurgica, intensivistica)
2. Fattori di rischio associati alle diverse tipologie di pazienti.
3. Determinazione della prevalenza e della sensibilità agli Antibiotici.

Materiali e metodi: Abbiamo condotto una sorveglianza relativa agli anni 2008-2009 in tutti i reparti dell'azienda ospedaliera g. Brotzu (600 posti letto), attraverso una individuazione retrospettiva di tutti gli episodi infettivi da acinetobacter, utilizzando il sistema copernico (Biomerieux). Per l'identificazione dei ceppi e relative sensibilità è stato utilizzato il sistema vitek 2 (Biomerieux). Inoltre di tutti i casi abbiamo analizzato le rispettive cartelle cliniche con raccolta dei dati demografici (età, sesso) e clinici (fase di malattia sito di infezione, reparto di ricovero).

Risultati: I pazienti esaminati sono stati 67, di cui 47 maschi e 20 femmine, con una età media di 60 anni. Le colture positive sono state 176, di cui la maggior parte di provenienza dal distretto respiratorio 52%, nello specifico abbiamo isolato 5 differenti ceppi: Acinetobacter baumannii, a.baumannii complex, a.haemolyticus, a.junii, a.lwoffii; i reparti maggiormente interessati sono le terapie intensive (66%) e le chirurgie (12%). Per quanto riguarda le sensibilità agli antibiotici da noi testati, sono risultati sensibili al 100%, colistina, minociclina, pefloxacina, ticarcillina, ticarcillina/ac.clavulanic.

Conclusioni: Si evidenzia la presenza costante del germe nei pazienti ricoverati presso le unità di terapia intensiva. L'isolamento del germe negli altri reparti è legato al rientro dei pazienti dalle terapie intensive, e soprattutto attraverso il personale ospedaliero che può essere colonizzato. Riteniamo pertanto utile che vengano applicate adeguate norme igienico-comportamentali: Trasferimento informato, isolamento del paziente, presenza di personale dedicato, e uso costante di disinfettanti.

PREVALENZA DI INFEZIONI E COINFEZIONI DELLA CERVICe UTERINA E IMPLICAZIONI DIAGNOSTICHE ED ORGANIZZATIVE

D-11

L. Bianchi, Z. Napoli, A. Baroncelli, P. Lencioni, R. Lari

U.O. Laboratorio Analisi, ASL 3 Pistoia

Introduzione. L'infezione con Papilloma Virus ad alto rischio oncogeno (HR-HPV) e la persistenza sono i fattori di rischio più importanti per il cancro della cervicce, mentre le infezioni dovute a C.trachomatis (CT), N.gonorrhoeae (NG), M.hominis (MH) e U.Urealitycum (UU) sono responsabili di cervicitis più o meno gravi e possono essere causa di infertilità.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare: 1) la prevalenza di CT, NG, MH, UU per selezionare eventuali classi di età su cui effettuare uno screening per le maggiori MST; 2) le coinfezioni anche con un altro virus, l'HPV e la correlazione con le alterazioni citologiche ed istologiche.

Materiali e metodi. In una popolazione di 300 donne di età compresa fra 18 e 70 anni sono state ricercate:

a) CT, NG, MH e UU utilizzando una multiplex PCR qualitativa "home made" e i risultati confrontati con metodi utilizzati in diagnostica, rispettivamente, il test ProbeTec ET (BD) per CT, colturale selettivo con incubazione per 48 h in 10% di CO₂ per NG, colturale su piastre A7 e con il metodo Mycoplasma IST2 (BioMerieux) per UU e MH; b) il test Inno-LiPA (Innogenetics), per la ricerca di HPV.

Risultati. Il 4,6% delle donne sono positive a CT e le coinfezioni sono spesso con UU e NG; la positività maggiore è nella fascia di età 23-27 aa ed è del 20%. Il 9,3% sono positive alla NG e le coinfezioni sono rare. Le fasce di età 33-37 e 38-42 sono quelle che hanno la positività più alta (8,3% e 12,5%). Il 7,3% sono positive a MH con la frequenza più alta nelle fasce di età descritte per la NG. L'HPV è presente nel 17,24% delle donne. La positività maggiore si ha nella classe di età 18-27 anni (33%). I genotipi più frequenti sono 16 e il 31; il 65% dei casi positivi all'HPV lo sono anche all'UU. Il 38% dei pazienti con lesioni citologiche ASCUS presentano coinfezione fra HR-HPV e UU.

Conclusioni. I nostri dati indicano che: 1) lo screening per CT andrebbe effettuato almeno per le donne fino a 27 anni, la NG sarebbe da ricercare in tutte le donne con manifestazione clinica, come patologia primaria o coinfezione. Essendo la persistenza dell'infezione da HPV la causa delle lesioni cervicali di alto grado, il virus andrebbe ricercato, almeno, nelle donne con età compresa fra 30-45 anni; 2) l'elevata percentuale di coinfezioni implica una revisione dell'organizzazione della diagnostica in questo campo trovando il Gold Standard in un'analisi a largo spettro degli agenti patogeni più comuni per fornire una risposta più appropriata ed una razionalizzazione delle risorse umane, che potrebbe essere l'estrazione del DNA da prelievo unico e multiplex-PCR.

INFEZIONI URINARIE: UNO STUDIO CASO-CONTROLLO

D-12

E. Trabuio, S. Valverde, F. Antico, P. Maturi, G. Gessoni

SMLA-ULS 14 Chioggia

Scopo del Lavoro: Nella nostra esperienza nel 4% dei casi si ha un fallimento della terapia di approccio alle infezioni acute delle vie urinarie (UTI). Scopo del presente lavoro è quello di valutare se la quantificazione di batteri e leucociti con UF-100 eseguita 1 giorno dopo l'inizio della terapia, possa fornire una indicazione prognostica.

Materiali e Metodi: Nel I Semestre 2008 abbiamo eseguito 1689 Urinocolture di pazienti ricoverati, 608 (36%) erano positive. Di queste è stato esaminato un secondo campione raccolto 24 ore dopo l'inizio della terapia. Abbiamo paragonato la quantificazione di Batteri e WBC alla diagnosi (t0) e dopo 24 ore (t24) di terapia.

Risultati: In 67 casi (4%) si aveva fallimento della terapia, documentato dal riscontro di una seconda urinocoltura positiva entro 7 dì. Per ciascun non-responder (caso) abbiamo selezionato come controllo il paziente responder immediatamente seguente nel file. Ma solo per 26 di questi è stato possibile effettuare la valutazione dopo 24 h. I risultati si riferiscono quindi a 26 coppie di pazienti e sono riportati nella tabella sottostante.

Tabella I: Risultati per Batteri e Leucociti in pazienti Responder e non Responder

Pazienti Responder (controllo)				Pazienti non Responder (caso)			
Bact t0	34777	WBC t0	1847	Bact t0	25992	WBC t0	2114
Bact t24	2902	WBC t24	61	Bact t24	25382	WBC t24	1741
Delta %	- 93%	Delta %	- 86%	Delta %	+ 12%	Delta %	- 21%
Patologici	5 - 19%	Patologici	18 - 69%	Patologici	26 -100%	Patologici	26 -100%

Conclusioni: I risultati ottenuti, sebbene assai preliminari, sembrano suggerire un discreto valore prognostico della quantificazione della batteriuria eseguita con UF-100 a t24. La diminuzione dei WBC sembra invece più tardiva e quindi meno significativa a t24.

EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI FUNGINE DI CUTE ED ANNESSI NEGLI ANNI 2007-2008: STUDIO RETROSPETTIVO

D-13

I. Cerino, R. Irace, P. Martora, L. Solaro, G. Rossi, G. Gaudiano, R. Nasti, L. Clemente

ASL SA - U.O.S. Microbiologia-Micologia-Parassitologia, P.O. "Umberto I", Nocera Inferiore (SA)

Scopo dello studio: Lo studio di tipo retrospettivo intende valutare l'incidenza delle infezioni fungine di cute ed annessi negli anni 2007-2008, su campioni prelevati da pazienti in prevalenza ambulatoriali, in parte provenienti dalla U.O.C. di dermatologia dell'ex ASL.Sa1, pervenuti al nostro Laboratorio. Dei campioni positivi ne è stata specificata la specie.

Materiali e metodi: i campioni prelevati dopo accurata disinfezione con etanolo 70% della cute e degli annessi (unghie e capelli) sono stati sottoposti ad esame microscopico diretto dopo macerazione con KOH al 20%, quindi seminati su Agar Sabouraud con gentamicina e cloramfenicolo, nonché su agar Sabouraud con cloramfenicolo e cicloeximide per inibire i contaminanti. Quindi sono stati incubati a 30° per almeno due settimane. Le colture positive sono state poi valutate macroscopicamente e microscopicamente; i lieviti sono stati identificati con prove biochimiche (Vitek 2 Biomérieux).

Risultati: Negli anni 2007-2008 sono stati prelevati 277 campioni, di cui 100 positivi, così di seguito ripartiti:

- 58 positivi per lieviti
- 8 positivi per *Microsporum* spp.
- 21 positivi per *Trichophyton* spp.
- 10 positivi per *Aspergillus* spp.
- 2 positivi per *Acremonium* spp
- 1 positivo per *Scopulariopsis brevicaulis*

I prelievi positivi per *Aspergillum* spp. sono stati poi ripetuti per conferma con esame microscopico diretto risultato sempre positivo.

Conclusioni: la diagnosi micologica, dermatologica e non, riveste sempre più importanza nel laboratorio di microbiologia, dove è essenziale acquisire competenze specifiche sia nelle modalità di prelievo che nella valutazione microscopica.

ISOLAMENTO DI S.AGALACTIAE IN DONNE IN GRAVIDANZA: L'ESPERIENZA DI UN ANNO IN UN OSPEDALE CAMPANO

D-14

P. Martora, R. Irace, I. Cerino, L. Solaro, G. Gaudiano, R. Nasti, G. Rossi, L. Clemente

ASL SA-U.O.S Microbiologia-Micologia-Parassitologia, P.O. Umberto I, Nocera Inferiore (SA)

Scopo del lavoro: La colonizzazione materna da *Streptococcus agalactiae* (GBS) durante la gravidanza aumenta il rischio di infezioni neonatali per trasmissione verticale, associate ad elevata morbilità e mortalità. Lo screening per la ricerca di S.agalactiae e una opportuna profilassi antibiotica intraparto, attuata sulle donne portatrici, costituisce una strategia di prevenzione molto utile. Diversi lavori hanno dimostrato che l'utilizzo di terreni cromogeni per lo screening di GSB garantisce una elevata sensibilità e specificità, oltre a fornire risultati in tempi rapidi rispetto alla coltura tradizionale. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la prevalenza di *Streptococco* di gruppo B ottenuta da uno screening effettuato su campioni vaginali e rettali di pazienti gravide alla 35a-37a settimana di gestazione, utilizzando un terreno solido selettivo cromogeno.

Materiali e metodi: Nell'anno 2008 sono stati esaminati 645 tamponi vaginali e 577 tamponi rettali di donne in gravidanza. La discrepanza tra il numero di tamponi rettali e vaginali è data dal fatto che in alcuni casi, per lo screening, è stato inviato in laboratorio il solo tampone vaginale. I campioni sono stati seminati su terreno CHROMID STREPTO B (Biomérieux). I terreni sono stati incubati a 37° C in aerobiosi. La lettura è stata effettuata dopo 18-24 ore: le colonie sospette, di colore rosa malva, sono state confermate mediante test di agglutinazione al lattice utilizzando il kit Avipath Strep (Omega Diagnostics) e, successivamente identificate biochimicamente utilizzando il sistema Vitek2 (Biomérieux).

Risultati: Sono risultati positivi per GSB 102 tamponi su 645 tamponi vaginali esaminati (15.8%) e 102 tamponi su 577 tamponi rettali esaminati (18%). Non è stato rilevato nessun falso positivo sul terreno terreno cromogeno utilizzato. Tutti gli isolati sospetti sono stato confermati biochimicamente.

Conclusioni: La frequenza di isolamento di *Streptococcus agalactiae* dai tamponi vagino/rettali esaminati concorda con quanto riportato in letteratura (10-20 %). Questo dato suggerisce che l'utilizzo dei terreni cromogeni, che rivelano anche rari ceppi non emolitici, sia un buon metodo per effettuare lo screening di GBS nelle gestanti. L'identificazione delle colonie su tali terreni risulta semplice, senza necessità di ulteriori isolamenti in caso di colture miste. La più alta percentuale di isolamento nei tamponi rettali rispetto ai vaginali conferma, a nostro parere, l'opportunità di effettuare lo screening utilizzando sempre sia il tampone vaginale che il tampone rettale, oppure un tampone vagino/rettale, per ridurre i falsi negativi.

SCREENING DI MRSA DA TAMPONI NASALI E DI MRSA/MSSA DA EMOCOLTURE: NUOVO TEST IN PCR REAL-TIME

D-15

P. Martora, I. Cerino, M. Medolla, L. Clemente

ASL SA-U.O.S. di Microbiologia-Micologia-Parassitologia, P.O. Umberto I di Nocera Inferiore (SA)

Scopo del lavoro: *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) e meticillino-sensibile (MSSA) possono essere responsabili di infezioni che interessano diversi distretti dell'organismo. L'isolamento di ceppi MRSA ed MSSA dal sangue costituisce un fattore prognostico negativo. Perciò l'identificazione rapida di questi ceppi dalle emocolture positive costituirebbe un notevole vantaggio terapeutico. La principale misura di controllo per ridurre la trasmissione di MRSA in ospedale, invece, è costituita dall'identificazione dei portatori all'atto del ricovero. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'utilizzo del sistema in PCR Real-Time GeneXpert Cepheid nella identificazione rapida dei ceppi MRSA da tamponi nasali e di MRSA/MSSA da emocolture, rispetto ai sistemi colturali tradizionali.

Materiali e metodi: Sono stati utilizzati per lo screening di MRSA i tamponi nasali di 42 pazienti in ammissione in ospedale. Ad ogni paziente sono stati prelevati due tamponi nasali, uno per il saggio molecolare, eseguito immediatamente, l'altro per la coltura. Ai terreni abitualmente usati per la coltura è stato aggiunto il terreno cromogeno MRSA agar (Biomérieux), con una riduzione dei tempi di incubazione di 16 ore. Trenta emocolture di pazienti ricoverati, che la colorazione di Gram aveva rivelato positive per cocchi Gram +, sono state testate in molecolare per la ricerca di MRSA/MSSA e poste in coltura utilizzando i terreni suddetti. I terreni sono stati incubati a 37° C in atmosfera aerobica e letti a 24 e 48 ore. Il risultato dell'esame molecolare è stato comunicato dopo meno di 2 ore al personale medico dei reparti. Per l'identificazione biochimica e l'antibiogramma è stato adoperato il sistema Vitek 2 (Biomérieux).

Risultati: Due tamponi nasali (4.7%) sono risultati MRSA-positivi in molecolare. Tutte le emocolture sono risultate MRSA-negative, 2 sono risultate positive per MSSA (6.6%). Tutti gli MRSA/MSSA sono stati identificati anche attraverso i metodi colturali tradizionali. I test di suscettibilità agli antibiotici eseguiti hanno confermato sia i risultati negativi che i risultati positivi ottenuti con il test molecolare. Tra i tre metodi utilizzati è stata riscontrata una concordanza del 100%.

Conclusioni: Il nostro studio dimostra che il sistema molecolare testato è efficace per l'identificazione in tempi molto rapidi di MRSA/MSSA. La combinazione dei metodi molecolari con la coltura riduce il Turn Around Time (TAT) di circa 24-40 ore. In ospedale questo facilita l'ottimizzazione della terapia e dei meccanismi di controllo della diffusione di questi patogeni e delle infezioni.

VALUTAZIONE DI UN NUOVO TEST DI AGGLUTINAZIONE AL LATTICE PER L'IDENTIFICAZIONE RAPIDA DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS

D-16

G. Del Giudice, L. Brugnera, M. Battistel, E. Modolo, R. Schiavon, A. Tessari, G. Bertiato

U.O. Laboratorio Analisi, Ospedale San Martino di Belluno, ULSS n.1, Veneto

Scopo del lavoro: *Staphylococcus aureus* rappresenta una causa comune di infezione in ambito comunitario e ospedaliero che necessita di una diagnosi laboratoristica rapida ed efficace. I test di agglutinazione al lattice rappresentano uno prezioso strumento diagnostico in grado di identificare il batterio a livello di specie in pochi minuti permettendo il pronto allestimento della terapia empirica più appropriata. In questo studio prospettico sono state valutate la sensibilità e la specificità del test di agglutinazione al lattice Prolex™ Staph Xtra Latex Kit (Pro-Lab) per l'identificazione di *Staphylococcus aureus*.

Materiali e metodi: lo studio è stato condotto utilizzando 60 ceppi di *S. aureus*, di cui 30 resistenti alla meticillina (MRSA), e 30 stafilococchi coagulasi negativi (CNS), tutti di isolamento clinico unitamente ai ceppi ATCC 29213, 25923 e 1228. Dieci batteri Gram positivi non stafilococchi sono stati utilizzati come controllo negativo. L'identificazione degli stafilococchi e l'antibiogramma sono stati effettuati mediante strumento BD Phoenix™ (Becton Dickinson) utilizzando la card PMIC/ID53 sulle colonie che cresciute su terreno Columbia con 5% di sangue di montone presentavano la tipica morfologia e che alla microscopia al Gram apparivano come cocchi Gram positivi disposti a grappoli. Come test comparativo è stato utilizzato il kit di agglutinazione al lattice Staphytest Plus™ (Oxoid).

Risultati: il test Prolex™ Staph Xtra Latex Kit ha mostrato una sensibilità di rilevamento di *S. aureus* del 95% e in particolare del 90% per gli MRSA e del 100% per i meticillino sensibili (MSSA). La specificità del metodo, valutata utilizzando i ceppi di stafilococco coagulasi negativi, si è rivelata del 90%. Il kit Staphytest Plus™ si è dimostrato in grado di identificare *S. aureus* nel 96.7% dei casi, con la medesima sensibilità sia per MRSA che per MSSA, mentre la specificità è stata del 76.7%.

Discussione e Conclusioni: Il progressivo aumento della diffusione in ambito comunitario e ospedaliero di germi patogeni come *S. aureus* resistente alla meticillina rende necessario limitare l'uso improprio degli antibiotici attraverso una diagnostica microbiologica rapida e di facile esecuzione. In questo studio preliminare, il sistema Prolex™ Staph Xtra Latex Kit ha permesso l'identificazione di *S. aureus* in pochi minuti con un elevato livello di affidabilità, mostrando una sensibilità comparabile a quella del kit Staphytest Plus™ e una maggiore specificità diagnostica. Prolex™ Staph Xtra Latex Kit, al pari di Staphytest Plus™, sembra pertanto rappresentare un valido strumento per la diagnosi preliminare delle infezioni associate a questo agente patogeno.

CONFRONTO TRA MULTIPLEX REAL TIME PCR ED EMOCOLTURA NELLA DIAGNOSI ETIOLOGICA DI SEPSI ACQUISITA IN COMUNITA'

D-17

P. Diamante, S. Zamparo, S. Grosso, N. Tosoni, P. Zigante, M.L. Modolo, M. Avolio, P. Stano, A. Camporese
S.C. di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera S.Maria degli Angeli, Pordenone

Scopo del lavoro. L'emocoltura è considerata il gold standard per la diagnosi di batteriemia, nonostante tale metodo sia inficiato da una ridotta sensibilità, come attestato da diversi Autori, in merito soprattutto al ridotto valore predittivo negativo dovuto a molteplici fattori legati al paziente, al trattamento in corso e alla gestione della fase preanalitica. Al tempo stesso, esiste talora un'oggettiva difficoltà nel distinguere tra batteriemia vera e colonizzazione. E' altrettanto noto, peraltro, che in corso di sepsi la precocità della terapia è decisiva ai fini prognostici, e numerosi studi in letteratura ormai dimostrano che la rapidità di intervento è associata ad una concreta riduzione della mortalità. Con l'obiettivo di mettere a disposizione del nostro laboratorio un metodo che in situazioni di criticità consenta di ottenere una maggiore sensibilità rispetto all'emocoltura, si è scelto di utilizzare recentemente il sistema SeptiFast (Roche Diagnostics, Milano, Italia), una multiplex Real-time PCR in grado di rilevare in un'unica seduta analitica parallela e in poche ore 25 microrganismi (batteri e miceti) comunemente responsabili di sepsi.

Materiali e Metodi. Nel presente lavoro abbiamo inteso valutare le performance di SeptiFast in una popolazione non ancora studiata, rappresentata da pazienti con sepsi acquisita in comunità. In un semestre sono stati arruolati 144 pazienti adulti (>18 anni), giunti al Pronto Soccorso del nostro Ospedale con sospetto clinico di sepsi e presenza di due o più criteri di SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), secondo Louie et al. (Crit Care Med, 2008). I risultati ottenuti con SeptiFast sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle emocolture, considerate come gold standard, prelevate contestualmente e processate utilizzando il sistema Bact/Alert (BioMérieux Italia, Firenze, Italia).

Risultati. Su 144 pazienti esaminati, 53 (37%) sono risultati positivi con almeno uno dei due metodi; in 30 casi (21%) è stato rilevato lo stesso microrganismo con entrambi i metodi; in 13 casi (9%) sono stati isolati con l'emocoltura microrganismi non rilevati da SeptiFast: tra questi, due soli (1.4%) sono stati considerati veri falsi negativi, in quanto 7 isolamenti erano rappresentati da stafilococchi coagulasi negativi, interpretabili come contaminazione secondo i criteri di Weinstein (J Clin Microb, 2003), e 4 isolamenti erano rappresentati da microrganismi non previsti dal SeptiFast test menu. In 10 casi (7%) è stata invece rilevata una falsa negatività dell'emocoltura, in quanto SeptiFast ha consentito di rilevare il DNA di microrganismi correlati alla malattia, contestualmente documentati da altri materiali biologici correlabili all'evento clinico (urine, pus, BAL, liquor).

Discussione e Conclusioni. I risultati analitici ottenuti con SeptiFast hanno consentito un notevole miglioramento dell'efficienza e dell'efficacia diagnostica in un contesto clinico critico e del tutto inedito, quale quello della sepsi acquisita in comunità, con particolare riferimento al valore predittivo negativo e positivo rilevato, a cui si aggiunge la marcata riduzione del turnaround time rispetto all'esame colturale. I risultati di SeptiFast, disponibili in sole 7 ore dall'arrivo in laboratorio, consentono di ottenere un notevole clinical outcome improvement rispetto alla diagnostica tradizionale.

MSSA E MRSA: SENSIBILITÀ INTRA ED EXTRAOSPEDALIERA, POLITICA DEGLI ANTIBIOTICI E CONTENIMENTO DELLA DIFFUSIONE

D-18

D. Piccoli, A. Accordini, S. Gaino, R. Sforza, G. Saccani, M. Caputo
Laboratorio Analisi Cliniche e Microbiologia, AUSL22 Veneto, Bussolengo (VR)

Scopo del lavoro. La resistenza agli agenti antibatterici è uno dei maggiori problemi di salute pubblica in tutto il mondo. Il primo passo per una efficace risposta consiste nel conoscere le dimensioni del problema nella propria realtà sanitaria. Abbiamo voluto valutare l'utilità di un'analisi del numero di isolati per stafilococchi meticillino-resistenti (MRSA) e meticillino-sensibili (MSSA) per pazienti interni, utenti esterni, residenti in Residenze Sanitarie Assistite (RSA), monitorando il trend delle resistenze agli antibiotici testati, la segnalazione degli isolamenti di MRSA, gli effetti della introduzione delle colture di sorveglianza attiva per MRSA.

Materiali e metodi: Studio retrospettivo dei risultati tra gennaio 2006 e giugno 2009, dopo accurata operazione di pulizia dei dati da cui sono stati eliminati tutti i record che si presentavano come replicati per paziente. Lo studio è stato condotto su 1140 pazienti.

Risultati: La % di MRSA vs MSSA nella ULSS 22 è aumentata dal 6% del 1° semestre 2006 al 16.7% del 2009 per i pazienti esterni, dal 6% al 12.7% per gli interni, dallo 0% al 7.4% nelle RSA. L'analisi ha evidenziato che i ceppi MRSA isolati rispetto ai totali S. aureus provengono da: Lesioni cutanee/Pus: per il 9.0%, seguiti da Urine 6.8%, secrezioni respiratorie 6.5%, Sangue 0.3%, altri materiali 2.4%. Per quanto riguarda la chemiosensibilità di MRSA e MSSA gli antibiotici presi in considerazione: sono stati: Cotrimossazolo, Ac fusidico, Rifampicina, Levofloxacina, Ciprofloxacina, Clindamicina, Eritromicina, Tetraciclina, Teicoplanina, Vancomicina. I ceppi di MRSA isolati nelle RSA mostrano una marcata resistenza nei confronti dei fluorochinoloni.

Conclusioni: Si conferma la rilevanza del problema infettivologico a livello delle strutture assistenziali. La prevenzione delle infezioni ospedaliere e il miglioramento della gestione assistenziale si basa sul rispetto delle misure igieniche e sull'uso mirato dell'antibiotico, obiettivi perseguibili attraverso il coinvolgimento e la formazione continua del personale. Proposta: Audit cycle per il controllo delle infezioni ospedaliere e per l'applicazione delle buone pratiche di handwashing. L'introduzione delle Colture di Sorveglianza Attiva per MRSA è senz'altro in grado di fornire un valido aiuto per valutare la frequenza di colonizzazione in tutti i pazienti e gli operatori addetti all'assistenza. E' in programma l'applicazione del sistema di segnalazione degli alert anche al di fuori dei reparti ospedalieri dal momento che esiste un rapporto strettissimo tra RSA e Ospedale. Un affinamento della strategia di intervento è l'inserimento nel protocollo interno della piastra di MRSA screen nelle semine dei flaconi di emocoltura positivi.

STUDIO EPIDEMIOLOGICO: CONSUMO DI ALCOOL NELLA PROVINCIA DI POTENZA NEL TRIENNIO 2006 – 2009

E-01

B.A. Nocera, D. Tummiolo, R. Beneventi

U.O.S. Laboratorio d'Urgenza A.O. "San Carlo" Potenza

Introduzione: L'abuso di alcool rappresenta un problema medico sociale in considerazione delle patologie correlate ed ha assunto la connotazione di piaga sociale. L'alcool è causa diretta ed indiretta di malattie acute e croniche, incidenti stradali ed infortuni sul lavoro. L'alcoolismo rappresenta un disturbo a genesi multifattoriale (bio-psico-sociale) associato ad assunzione protratta di bevande alcoliche, con conseguente sofferenza pluridimensionale che si estrinseca in maniera diversa da individuo ad individuo. Modica quantità di alcool produce euforia, logorrea, disinibizione e tachicardia, l'aumento della quantità induce inizialmente diminuzione dell'autocontrollo e successivamente stato di ebbrezza, fino ad ubriacatura caratteristica dell'intossicazione acuta da alcool.

Scopo del lavoro: L'aumento di richieste di dosaggio dell'alcoolemia nel corso degli anni, pervenute all'U.O.S. del Laboratorio di Urgenza dell'A.O. San Carlo di Potenza sia dal P.S. che da altri Presidi Ospedalieri della provincia hanno spinto gli autori ad intraprendere uno studio per evidenziare l'effettiva entità del problema, la tipologia dei soggetti coinvolti, l'andamento del fenomeno nel corso del tempo e la rilevanza sociale.

Materiali e Metodi: La determinazione dell'alcoolemia è stato effettuato nel Laboratorio di Urgenza dell'A.O. San Carlo di Potenza su Synchron CX (Beckman) con metodo enzimatico, su campioni di siero o plasma.

Risultati: Per 1317 campioni è stato richiesto il dosaggio dell'alcol e la ricerca di sostanze d'abuso nel 90% dei casi, per il rimanente 10% la richiesta era mirata al solo dosaggio dell'alcoolemia.

Conclusioni: Dall'analisi dei dati ottenuti si sono potuti suddividere i risultati per età, provenienza e ricaduta. Si è evidenziato un aumento significativo del consumo di alcool: da 255 casi del 2006 a 396 nel 2007, a 462 del 2008 e a 284 del 2009 (al 21/08/2009). Per fasce di età si sono evidenziati 3 gruppi con maggiore frequenza di richiesta: I° soggetti nati fra il 1980/1990, II° soggetti nati fra il 1968/1978 e III° soggetti nati fra il 1948/1958. I dati emersi più significativi sono: 1) elevata percentuale di pazienti giunti in P.S. per abuso di alcool, 2) drastica riduzione dell'età media dei "consumatori" e 3) notevole frequenza di ricadute. Quanto riscontrato forse rappresenta solo la "punta di un iceberg" in quanto espressione dei soli soggetti giunti in Pronto Soccorso a seguito di incidenti stradali o malori non collegabili apparentemente all'abuso di alcool, per cui si può ritenere che il numero reale dei consumatori nella Provincia di Potenza sia molto elevato.

"DROGA" MODERNA EPIDEMIA: INDAGINE SUL CONSUMO DI SOSTANZE PSICOTROPE NELLA PROVINCIA DI POTENZA NEL TRIENNIO 2006 - 2009

E-02

B.A. Nocera, M. Nolè, R. Beneventi

U.O.S. Laboratorio d'Urgenza A.O. "San Carlo" Potenza

Introduzione: Il consumo di sostanze psicotrope, negli ultimi anni, ha assunto soprattutto fra i giovani una rilevanza preoccupante tanto da diventare un fenomeno di enorme rilevanza sociale. L'uso di cannabis fra gli italiani soprattutto adolescenti, si è più che raddoppiato tra il 2002 e il 2007, con una incidenza annuale del 14,6%: la più alta in Europa e una delle più elevate al mondo. Nei riguardi dell'eroina in Italia si contano 300.000 consumatori, numero che pone il nostro paese al secondo posto nella UE, solo dopo l'U.K. Nei riguardi della cocaina il 2,2% della popolazione ne fa uso abitualmente e/o saltuariamente tanto che anche nei riguardi di tale sostanza il nostro Paese si colloca al terzo posto dopo U.K. e Spagna.

Scopo del lavoro: Gli autori hanno effettuato nel triennio 2006-2009 un'indagine epidemiologica su 628 soggetti della Provincia di Potenza per evidenziare l'andamento, l'incidenza e la rilevanza del fenomeno "droga".

Materiali e metodi: Nel presente studio è stato utilizzato lo strumento Triage (Biosite) che adopera il Tox Drug Screen: immunodosaggio competitivo a fluorescenza che analizza il rilevamento simultaneo di droga e/o dei principali metaboliti urinari di dieci classi diverse di droghe. (APAP=Paracetamolo, AMP Amfetamine, mAMP Metamfetamine, BAR Barbiturici, BZO Benzodiazepine, COC Cocaina, MTD Metadone, OPI Oppiacei, PCP Fenciclidina, THC Cannabinoidi, TCA Antidepressivi triciclici).

Risultati: Dai dati ottenuti sono emerse una serie di considerazioni circa sesso, età, provenienza e incidenza di recidività dei pazienti, e soprattutto l'aumento esponenziale del consumo di queste sostanze che è passato da un esiguo numero di 53 casi del 2006 ai 158 nei primi sette mesi del 2009. L'analisi della distribuzione tra maschi e femmine ha rilevato, come dato globale, una percentuale di positività nel 62% di uomini rispetto al 38% delle donne, mentre l'analisi delle casistiche annuali ha evidenziato un notevole incremento dell'uso nel sesso femminile. I dati più preoccupanti emersi dal seguente studio sono: l'elevata incidenza di pazienti giunti in Pronto Soccorso per abuso di sostanze psicotrope ma, soprattutto, la drastica riduzione dell'età media dei consumatori e la frequenza di soggetti recidivi.

Conclusioni: La disamina dei dati ottenuti evidenzia che i soggetti esaminati esclusivamente provenienti dai Pronto Soccorso, e pertanto in maggioranza, sono stati screenati a causa di incidenti stradali o malori non apparentemente collegabili all'abuso di sostanze psicotrope, pertanto si ritiene che il fenomeno dell'uso di tali sostanze sia molto più diffuso e che il numero reale dei consumatori nella Provincia di Potenza sia notevolmente sottostimato.

I COSTI DELL'INAPPROPRIATEZZA IN COAGULAZIONE**E-03**

G. Martini, R. Del Bono, R. Volpi, F. Bontempi, A. Jäger, R. Morandini, S. Testa, S. Pedrini, O. Paoletti, A. Alatri, G. Antonucci, L. Caimi

1^a Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, AO Spedali Civili di Brescia; Unità Operativa di Laboratorio Analisi, Ospedale di Cremona; Laboratorio Analisi, Fondazione Poliambulanza, Brescia; UO Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Addolorata - Roma

Premesse. Lo studio si prefigge di valutare i costi delle richieste inappropriate dei test di coagulazione di II livello nell'ambito delle diatesi trombofiliche ed emorragiche. *Metodi.* Tutte le richieste dei test di coagulazione di secondo livello pervenute

Tabella I. Tipo e numero dei test emocoagulativi di secondo livello non eseguiti poiché ritenuti inappropriati dai medici del laboratorio con relativo costo (in euro) in sei mesi.

Test non eseguito	test non eseguiti in 6 mesi (n)	Prezzo di ogni test (in euro)	Euro risparmiati in 6 mesi
Test di aggregazione piastrinica secondo Born	16	198.1	3169.7
Agglutinazione piastrinica alla Ristocetina	3	77.2	231.7
Test di Resistenza alla Proteina C attivata	21	57.7	1212.0
Fattore della Coagulazione V	69	55.3	3813.4
Proteina C anticoagulante funzionale	37	55.3	2045.2
Proteina S libera	34	76.1	2588.0
Fattore della Coagulazione II	29	55.9	1620.1
Lupus AntiCoagulant (LAC)	7	75.9	531.1
Proteina C anticoagulante antigene	8	106.1	849.1
Fattore della coagulazione VIII	23	55.9	1286.1
Fattore della coagulazione IX	5	55.9	279.6
Fattore della coagulazione X	4	55.6	222.3
Fattore della coagulazione XI	3	56.4	169.2
Fattore della coagulazione XII	3	57.1	171.3
Fattore della coagulazione VII	14	57.3	802.4
Fattore della coagulazione XIII	6	56.8	340.9
Fattore della coagulazione von Willebrand funzionale	3	93.1	279.3
Fattore della coagulazione FVIII antigene	5	42.9	214.3
Tempo di trombina	2	12.1	24.2
Tempo di emorragia	1	2.9	2.9
Anticorpi anti-fattore VIII	2	80.4	160.7
Totale	295		20013.6

al settore Coagulazione del 1^a Laboratorio degli Spedali Civili di Brescia sono state analizzate per sei mesi. Per l'esecuzione di questi test il clinico deve compilare un modulo con i dati del paziente, utili per valutare l'appropriatezza della prescrizione. Sono state identificate le richieste inappropriate ed il numero e il tipo di test non eseguiti per tale ragione.

Risultati. 150 richieste di test di coagulazione di secondo livello su un totale di 1664 sono state definite inappropriate; 295 test non sono stati eseguiti con un conseguente risparmio di circa 20.000 euro in sei mesi (Tab. I).

Conclusioni. E' stato valutato solo l'aspetto economico dell'inappropriatezza ma l'aumento delle richieste può produrre anche risultati potenzialmente negativi per il paziente.

I2D2 - INFORMAZIONI INTEGRATE DNA DATABASE. PROGETTO DI GESTIONE E MESSA IN RETE DI DATI DIAGNOSTICI IN ONCOLOGIA MOLECOLARE**E-04**

E. Pitotti¹, V. La Volpe², M. Pisanò¹, G. Leo¹

¹U.O. Biologia Molecolare ed Oncologia Sperimentale ASL Lecce; ²U.O. Neurologia Policlinico Bari

Scopo dello studio: Secondo il paradigma della EBM, "Le azioni debbono essere basate sulle informazioni". La possibilità che informazioni riguardanti personalmente il paziente, quali il luogo di nascita, ambiente di vita e di lavoro, abitudini personali ed alimentari, così come la sua storia clinica, in relazione con i dati diagnostici, possano indicare nuove vie verso la comprensione di malattie semplici o complesse, come quelle oncologiche, è la nuova sfida che la ricerca medica è chiamata ad affrontare nell'immediato futuro. Lo scopo del presente studio è dimostrare come, applicando una METODOLOGIA SCIENTIFICA di GESTIONE dell' INFORMAZIONE BIOMEDICA, si possa ricavare INFORMAZIONE UTILE per la ricerca e DIRETTAMENTE TRASLABILE nella pratica clinica.

Metodi: Abbiamo effettuato uno studio, sul territorio nazionale, che ha evidenziato la carenza di un sistema informatizzato univoco in grado di integrare i dati dei pazienti oncologici con tumori eredo-familiari. Abbiamo progettato e realizzato una nuova banca dati con programma FileMaker Pro: I2D2 Informazioni Integrate Dna Database che può essere interrogata con delle queries, mettendo in relazione più campi tra le tabelle dei dati Anagrafici, Anamnestici Clinici, e Diagnostici, con i risultati delle indagini di Genetica molecolare. Il Database genererà un dato espresso in termini di frequenza statistica delle varie mutazioni genetiche, in relazione alle varie patologie oncologiche ed agli altri dati anamnestici dei pazienti.

Risultati: Il Database attualmente gestisce i dati dei pazienti che si sottopongono ad analisi di sequenziamento del Dna presso il Laboratorio di Oncologia Molecolare della ASL Lecce. Sulla base di questo studio è stato progettato il Database che gestirà i dati di uno Screening regionale sul carcinoma mammario eredo - familiare del quale è promotore l'IRCCS Oncologico di Bari. E' in itinere il progetto di mettere in rete il Database (preservando l'assoluta privacy dei pazienti), per dare la possibilità al clinico o il ricercatore di utilizzare informazioni importanti per la ricerca e la pratica clinica.

Conclusioni: Obiettivo ultimo del progetto è che possa essere condiviso da più Laboratori e Centri di ricerca oncomolecolari, in modo tale che, usando un sistema informatico standardizzato (in termini di algoritmi e di sintassi) possano "dialogare" tra di essi facendo in modo che il dato statistico si avvicini sempre di più al dato reale. Infine: la Biologia evolve da Scienza qualitativa a Scienza quantitativa. La parola chiave di questo cambiamento è: INTEGRAZIONE

- tra dati biomolecolari e dati clinici e anamnestici del paziente
- tra dati biomolecolari e tecnologie computazionali
- tra ricerca traslazionale e Istituzioni sanitarie

Le implicazioni Etiche e sociali che le indagini genetiche, con l'avvento delle nuove tecnologie, hanno portato pongono una serie di nuove problematiche nella gestione del paziente e della malattia. Tutta l'organizzazione sanitaria verrà probabilmente ristrutturata in funzione di quelle che saranno le maggiori risorse impegnate per la diagnostica predittiva, rispetto alle risorse impegnate per la cura del paziente.

LE BANDE OLIGOCLONALI LIQUORALI NELLA DIAGNOSI DELLA SCLEROSI MULTIPLA: REVISIONE ALLA LUCE DELL'ESPERIENZA NELL'ULTIMO DECENNIO

E-05

M. Golato¹, M. Maddestra², C. Crognale¹, F. Di Luca¹, F. Febbo¹, F. Indino¹, P. Pasquini¹

¹Patologia Clinica, ²Centro Sclerosi Multipla, Neurologia. OC Lanciano

Scopo del Lavoro. La diagnostica della Sclerosi Multipla (SM) è profondamente mutata nell'ultimo decennio (McDonald 2001, revisione di Polman 2005). Questi nuovi criteri, pur confermando il ruolo principe della clinica, hanno esaltato quello della Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) rispetto ai Potenziali Evocati e alle Bande Oligoclonali (BO) liquorali, cui è riservato un ruolo nei casi in cui la RMN non soddisfa i criteri di disseminazione spaziale o temporale necessari per la definizione diagnostica (criteri di Barkhof). In Europa la ricerca delle BO, resta costante nell'ambito degli accertamenti per sospetto di SM, a differenza del Nordamerica (liquor eseguito per escludere altre patologie). Riportiamo la nostra esperienza sulla ricerca delle BO nell'ultimo decennio per evidenziare gli aspetti peculiari nel rinnovato contesto diagnostico della SM.

Materiali e Metodi. Analisi BO: isoelettrofocusing su gel di agarosio ed immunoblotting (Helena). Inclusi nello studio 134 pazienti (pz), cui nell'ultimo decennio è stata diagnosticata SM o Sindrome Clinicamente Isolata (CIS), sindrome neurologica acuta o subacuta suggestiva per SM, (esordio clinico in pz con SM), sottoposti a rachicentesi (PL) per ricerca BO. Esclusi i pz con forme progressive primarie di SM.

Risultati. Dei 134 pz, 86 (64,2 %) hanno diagnosi di SM e 48 (35,8 %) di CIS. Gruppo CIS: età media alla PL 31 aa, composto per il 73 % da donne, le BO erano positive nel 62,5 % dei casi. Gruppo SM: età media alla PL 37,7 aa, composto per il 74,4 % da donne, le BO erano positive nell'81,4 % dei casi. Non si evidenziavano differenze di positività delle BO per sesso in entrambi i gruppi. Gruppo CIS: età media delle BO+ 29,4 aa, delle BO- 33,6 aa. Gruppo SM: età media delle BO+ 38,4 aa, delle BO- 34,8 aa. Le SM BO+ presentavano un'età media di malattia (tempo tra il 1° episodio clinico databile e esecuzione della PL) di 6,2 aa, le BO- di 3,8 aa. Analizzando singolarmente i dati: oltre i 6 aa di malattia sono pressoché introvabili i BO- (1 su 23) mentre fino a 6 aa è più frequente riscontrarne (15 su 63).

Discussioni e Conclusioni. Dai nostri dati si estrapola che la positività delle BO nella SM sia del 80-85 % (letteratura classica 90-95 %), con riduzione al 60-65 % nelle CIS, in accordo con la letteratura più recente. Il dato indipendente da sesso ed età, risulta influenzato dagli aa di malattia che precedono la valutazione. In particolare, nei primi 6 aa di malattia è più facile riscontrare casi con BO, successivamente è estremamente difficile, quindi tale termine si può considerare una red flag diagnostica (l'assenza di BO in un pz che presenta una storia clinica di oltre sei anni deve far fortemente riconsiderare la diagnosi di SM).

LE NUOVE TECNOLOGIE NELLA DIAGNOSI DELLE PATOLOGIE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

E-06

L. Tosti¹, I. Bianco¹, G. Menna¹, F. Di Luca¹, F. Febbo¹, F. Indino¹, P. Pasquini¹, U. Colangelo², M. Maddestra², M. Golato¹

¹Patologia Clinica, ²Neurologia O.C. Lanciano

Scopo del Lavoro L'analisi del Liquido Cefalo Rachidiano (LCR) è basilare nelle patologie del sistema nervoso centrale (SNC) per confermare l'ipotesi clinica su sintomatologia neurologica, supportare la diagnosi differenziale e monitorare l'evoluzione di patologie. Abbiamo effettuato la revisione degli esami eseguiti su LCR negli ultimi 2 anni per verificare l'apporto alla clinica alla luce dell'introduzione di nuove tecnologie (Citometria Automatizzata e Biologia Molecolare-BM).

Materiali e Metodi Esami eseguiti: chimico-fisico, citometrico-morfologico, colturale, batterioscopico, e ricerca: ag. batterici, virus neurotropi, IgG, bande oligoclonali (BO). Abbiamo automatizzato il conteggio delle cellule LCR con l'analizzatore SysmexXE-2100 che legge i liquidi biologici anche a bassa cellularità (sensibilità 90% concordante con i dati letteratura). La BM (sensibilità e specificità >90%) è soprattutto stata applicata alla ricerca dei virus erpetici, citomegalovirus e micobatteri tubercolari (BK). Analizzati 103 LCR con sospetto di infiammazioni acute del SNC. Utilizzati: SysmexXE-2100 (metodo ottico laser in fluorescenza), PCR di 3° generazione (Nanogen).

Risultati Dei 103 pazienti, sono risultati positivi (pos) ai test richiesti per i seguenti sospetti diagnostici per: 55 SM (BO pos in 81,4% e pos per danno di barriera nel 70% dei casi); 1 infiltrazioni neoplastiche (63 cell/μL, con linfocitosi); 14 meningiti linfocitarie (danno di barriera e pos per conteggio cellulare con linfocitosi); 3 infezione da Epstein Barr e 2 infezione erpetica da HSV1, 1 meningite batterica (595 cell/μL con 70% polimorfonucleati), 9 Poliradicoloneurite acuta (dissociazione albuminocitologica), 13 campioni con screezio meningo-encefalitico (glucosio pos), 12 campioni risultati negativi. I conteggi controllati al MO evidenziano totale concordanza (100%) sulle conte negative. La concordanza con le ipotesi cliniche è stata dell'88,3%.

Discussione e Conclusioni Le nuove tecnologie hanno aumentato l'efficacia del contributo del laboratorio alla diagnosi clinica. Il conteggio automatico ha garantito anche al personale meno esperto di fornire dati accurati considerando che l'esame citometrico/morfologico presenta difficoltà legate ai bassi cut-off di positività (>5cell/μL). Il supporto della BM sul liquor è stato fondamentale per le ricerche virali, anche ai fini dell'esclusione, in particolare nelle patologie infiammatorie di origine erpetica in cui è necessario iniziare tempestivamente la terapia, così come nella ricerca del BK, recrudescente anche a causa dei flussi migratori. L'apporto del laboratorio, fondamentale per la diagnosi precoce, è risultato conveniente anche in termini costi/benefici poiché evita il ricorso a terapie empiriche invece che mirate.

DETERMINAZIONE DELLA CISTATINA C E DELLE SUE ISOFORME CON METODICA NEFELOMETRICA E CON TECNICA PROTEOMICA SU CAMPIONI DI LIQUIDO CEFALORACHIDIANO DI SOGGETTI AFFETTI DA SCLEROSI MULTIPLA

E-07

I. Cataldo¹, M. Flacco¹, P. Del Boccio², D. Pieragostino², F. Petrucci², M. Di Ioia³, A. Lugaresi³

¹Pat.Clinica Osp.SS Annunziata Chieti; ²Dip.di Scienze Biomediche; ³Centro Sclerosi Multipla, Università "G.D'Annunzio" Chieti

Scopo del nostro lavoro è stato quello di determinare la concentrazione della Cistatina C (CysC) e delle isoforme in campioni di liquido cefalorachidiano (LCR) di pazienti con Sclerosi Multipla (SM) e di valutare la comparsa della forma N troncata della proteina con metodo nefelometrico e con tecnica di spettrometria di massa sottoponendo i campioni a differenti condizioni di conservazione, è noto infatti che la CysC nel LCR a -20° si degrada.

Metodi abbiamo arruolato 15 pazienti (età media di 38, 5 anni) affetti da SM. I pazienti sono stati sottoposti a rachicentesi; i campioni subito dopo centrifugazione suddivisi in 3 aliquote conservate a 3 diverse temperature: T0 (conservazione in azoto liquido N-1), T4 (conservazione a 4°C per una settimana, poi in N-1), T20 (a -20°C per 20 giorni poi in N-1). Le 3 aliquote sono state dosate contemporaneamente con il N Latex CysC (Siemens) e spettrometria di massa MALDI-TOF.

Risultati l'analisi statistica è stata condotta usando l'analisi discriminante lineare (LDA) che permette di attribuire delle unità statistiche a gruppi di osservazioni precostituiti mediante l'uso di funzioni discriminanti definite da variabili che si ritiene abbiano un'importanza per l'adeguatezza dell'attribuzione. I 3 gruppi nefelometrici restituiscono misure aventi lo stesso ordine di grandezza (mediana, in parentesi il range): T0 1, 9 (0, 83-3), T4 1,4 (0, 7-2, 7); T20 1, 9 (1-3). Nei dati di proteomica le misure dell'intensità relativa della CysC troncata rispetto alla CysC normale discostano per due ordini di grandezza a causa di un troncamento N-terminale: T0 0,48% (0, 21-3); T4 0,48% (0, 16-0, 8); T20 55% (15-109). LDA condotta utilizzando la durata della malattia come criterio di classificazione e come variabili i dosaggi nefelometrici non restituisce una riclassificazione statisticamente significativa. Stesse conclusioni si ottengono considerando come variabili del modello discriminante i dati di proteomica e poi ripetendo le analisi stratificando il campione secondo il decorso della malattia. Anche l'esame chimico-fisico del LCR (proteine totali, dosaggio IgG) e gli indici liquorali (indice di Barriera e indice di Link) non permettono di riclassificare il campione statistico in base alla durata della malattia e/o decorso.

Conclusioni: Il dosaggio nefelometrico della CysC e l'analisi di proteomica non permettono di identificare il tipo di decorso e la durata di malattia. Inoltre la degradazione N-terminale della CysC non influenza le misure nefelometriche effettuate con il N Latex CysC. Ulteriori studi su un campione più ampio saranno necessari per avvalorare l'uso del test in ambito clinico.

UNA RARA PRESENTAZIONE DI FEOCROMOCITOMA

E-08

S. Martinotti¹, M.L. d'Aquino¹, R. Gelormini¹, P. Moio¹, M.L. Di Cocco¹, A. Esposito¹, M.L. D'Arcangelo¹, P. De Remigis²

¹U.O. Patologia Clinica I Ospedale Clinicizzato "SS Annunziata" Chieti, ²U.O. Endocrinologia Ospedale Clinicizzato "SS Annunziata" Chieti

Introduzione: Il Feocromocitoma (F) può presentare difficoltà diagnostiche perché si tratta di una patologia rara e ciò può costituire un motivo di misconoscimento. Inoltre può manifestarsi con quadri clinici complessi e forvianti, mentre il dosaggio delle metanefrine urinarie rappresenta un test accurato e fondamentale per la diagnosi.

Materiale e Metodi: MF di anni 48 perviene a ricovero per un quadro clinico insorto improvvisamente con dispnea e dolore precordiale. Ad una TAC torace ed all'ECG si evidenziano infarto polmonare e lesione cardiaca di tipo ischemico. Il giorno successivo insorge improvviso un quadro di emiparesi dx ed una TAC encefalo evidenzia una lesione ischemica in sede fronto-temporo-parietale sx. Viene eseguita anche una TAC addome che mette in evidenza aree infartuali al rene sx ed alla milza, mentre nel surrene dx si dimostra un processo neoformativo di 8x6,5 cm. Durante la degenza il quadro clinico è complicato dall'insorgenza di puntate ipertensive (con valori fino a 215/140 mmHg) e crisi di aritmie cardiache. Il sospetto di F viene provato con dosaggio delle metanefrine nelle urine delle 24h. Il metodo utilizzato è stato "The Bio-Rad Urinary Metanephrines by HPLC test for the quantitative of total metanephrines humane". Il risultato dell'esame cromatografico è stato di **63392 µg/24h** di metanefrina (v.n. 74-297 µg/24h) e di **1241 µg/24h** di normetanefrina (v.n. 105-354 µg/24h). Una volta stabilizzato il quadro circolatorio il soggetto è stato sottoposto a surrenectomia dx e l'esame istologico ha confermato trattarsi di un F.

Il controllo clinico post operatorio ha dimostrato la normalizzazione dei parametri cardiocircolatori senza alcuna terapia ed il dosaggio delle Metanefrine urinarie a 5 giorni dopo l'intervento è stato: metanefrina **303 µg/24h**, normetanefrina **147 µg/24h**.

Scopo e Risultati: Il caso descritto riguarda una presentazione complessa di un F (quadro multinfartuale a livello polmonare, cardiaco e cerebrale), che ha posto difficili problemi diagnostici. Sebbene l'elemento determinante per la diagnosi è rappresentato dall'ipertensione arteriosa, che si era già presentata con crisi ipertensive nel nostro pz da almeno un anno, un'esame di laboratorio relativamente semplice come il dosaggio delle metanefrine urinarie è indispensabile per indirizzare verso una rapida diagnosi di F che può evitare pericolose complicazioni della malattia.

EFFETTO DELLA NUOVA FORMULA CKP-EPI PER LA STIMA DELLA VELOCITÀ DI FILTRAZIONE GLOMERULARE NELLO SCREENING DELLA POPOLAZIONE GENERALE

E-09

D. Giavarina, G. Soffiati

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

Scopo del Lavoro. Valutare la nuova formula proposta dalla *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKP-EPI) (Ann Intern Med 2009;150:604-612), rispetto alla valutazione dell'insufficienza renale secondo la classificazione K-DOQI.

Metodi. La nuova formula è stata comparata con la MDRD semplificata (4 parametri) in 13.254 pazienti ambulatoriali consecutivi, 7.342 femmine, età media 53 ± 15 anni, e 5.912 maschi, 54 ± 14 anni. La creatinina è stata misurata con metodo enzimatico (Advia 2400, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).

Risultati. La tabella riassume il confronto e la concordanza nella classificazione K_DOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative).

Discussione. Nelle aspettative della nuova formula CKP-EPI la maggiore accuratezza dovrebbe migliorare la valutazione dei pazienti con ridotta funzionalità renale, soprattutto riducendo la percentuale di falsi positivi da stadio 3 (GFR < 60 ml per $1.73m^2$) a stadio <3. I nostri dati confermano l'ipotesi: abbiamo avuto una riduzione da stadio 3 a 2 in 190 soggetti su 4.592 (4%). La

e-GFR CKD-EPI	e-GFR MDRD Study, n (% di eGFR CKD-EPI)					Totale n (%)
	>90 mL/min per $1.73m^2$	60-89 mL/min per $1.73m^2$	30-59 mL/min per $1.73m^2$	15-29 mL/min per $1.73m^2$	<15 mL/min per $1.73m^2$	
>90 mL/min per $1.73m^2$	5.675 (71%)	2290 (29%)				7.965
60-89 mL/min per $1.73m^2$	23 (1%)	4.382 (95%)	190 (4%)			4.595
30-59 mL/min per $1.73m^2$			598 (99%)	5 (1%)		603
15-29 mL/min per $1.73m^2$			1 (1%)	72 (99%)		73
<15 mL/min per $1.73m^2$				1 (6%)	17 (94%)	18
Totale	5.698	6.672	789	78	17	13.254

riduzione maggiore si è ottenuta dallo stadio 2 (GFR tra 60 e 89 ml per $1.73m^2$) a 1 (GFR >89 ml per $1.73m^2$): 2.290 su 7.965, pari al 29%. La sistematica sottostima della GFR con la formula MDRD porta a dover refertare i valori più alti di GFR semplicemente come > 60 mL/min per $1.73m^2$; questo può rafforzare la convinzione errata che la funzione renale sia sempre normale in quelle con-dizioni. La riduzione dei falsi positivi ottenibile con la nuova formula consente di refertare valori oltre > 60 mL/min per $1.73m^2$, migliorando la sensibilità dello screening, senza perdere eccessivamente in specificità.

NOVE CASI DI "FALSA" TROPONINA I: CASISTICA NEL BIENNIO 2005-2008 DELL'U.O.S. LABORATORIO DI URGENZA A.O. SAN CARLO DI POTENZA

E-10

R. Beneventi, R. Villani

U.O.S. Laboratorio di Urgenza A.O. San Carlo di Potenza

Introduzione: Riconoscere un danno miocardico acuto in soggetti con dolore toracico è essenziale nella scelta dell'iter diagnostico-terapeutico per migliorare la prognosi del paziente: l'esclusione evita ricoveri impropri in reparti ad alta specializzazione con riduzione dei costi di degenza e danni sociopsicologici al paziente connessi all'accettazione di una grave malattia. Il laboratorio è fondamentale ed insostituibile nei casi board-line col dosaggio della Troponina I ad elevata affidabilità e praticabilità in regime di urgenza.

Scopo del lavoro: Esaminare aumenti "spuri" di TrI non legati ad IMA e valutarne le cause.

Materiali e metodi: Dosaggio di TrI su campioni in eparinato di litio e K3EDTA su strumenti ACCESS II BECKMAN e TRIAGE BIOSITE

Risultati: In base alla ridefinizione di IMA del 2007 dell'ACCF, AHA, l'ESC, WHF la TrI rappresenta, il "golden standard" nella diagnosi. Nel triennio 2005-2008 si è compiuto uno studio epidemiologico su 38.260 campioni che ha rilevato un incremento esponenziale del numero di richieste di dosaggio di TrI afferenti da tutte le U.O. dell'A.O. San Carlo di Potenza (soprattutto dal P.S. da 6777 casi del 2006 ai 14396 fino alla metà del 2008) e un'incidenza di "falsi" positivi (evidenziati in base alla discordanza fra i dati anamnestico - clinici e quelli di laboratorio). Lo studio ha confermato che, come riportato in letteratura, il dosaggio della TrI è richiesto con maggior frequenza nel sesso maschile rispetto al femminile a conferma della maggiore incidenza (3 volte superiore nell'uomo) delle malattie coronariche (angina ed infarto). Le mutate abitudini socio lavorative e di vita tuttavia ha portato, nel corso degli anni, ad un bilanciamento nel numero di richieste di esami fra i due sessi specie dopo i 60 anni. Nel corso dell'indagine si sono riscontrati 9 casi di "false troponine": 4 casi di Troponinosi definite in letteratura come incrementi spuri di TrI dovuti a cross reazione con componenti del plasma); dei casi riscontrati in 2 si è evidenziata presenza di anticorpi eterofili, in 1 iperbilirubinemia, ed in 1 occlusione intestinale. Dei restanti 5 casi con falsi incrementi di TrI 3 presentavano cardiopatie non imputabili ad IMA e 2 casi neoplasia in fase terminale.

Conclusioni: L'incidenza di false proponine e troponinosi riscontrata nel corso dello studio ha scarsa rilevanza per l'epidemiologia ma notevole per la clinica. I 2 metodi di dosaggi di TrI utilizzati presentano notevoli differenze metodologiche che producono, per dosaggi bassi, diversa imprecisione totale sia per limite di sensibilità che per precisione. La scarsa correlazione evidenziata fra i 2 dosaggi si ritiene sia dovuta alla differente risposta al tipo di anticorpo utilizzato e alla mancanza di uno standard universale.

EQUIPE MULTIDISCIPLINARE PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI PATOLOGIA GASTRICA**E-11****A. Caleffi¹, R. Merli², F. Di Mario², A. Franzè², M.T. Marino¹**¹U.O.Diagnostica Ematochimica; ²U.O.Gastroenterologia - Azienda Ospedaliero-Universitaria - Parma

Introduzione: Il Gastropanel è costituito da dosaggi su siero in E.L.I.S.A di Pepsinogeno I e II, Gastrina 17, anticorpi anti Helicobacter pylori e fornisce indicazioni sullo stato della mucosa gastrica.

Scopo: Per i pazienti che richiedono questo esame abbiamo costruito un nuovo percorso aziendale di cui analizziamo le fasi.

Materiali e metodi: Dal 2009 eseguiamo il test ai pazienti afferenti al Centro Prelievi dell' Azienda Ospedaliera di Parma. Le anamnesi vengono raccolte, al momento del prelievo, dal medico del Laboratorio su scheda predisposta. L'equipe (tecnici, biologo e medico) si occupa della fase analitica utilizzando test in ELISA (Biohit® Helsinki, Finlandia). Il medico di laboratorio, il biologo ed il gastroenterologo analizzano i risultati in relazione alle schede anamnestiche (sintomi, familiarità per gastropatie, abitudini alimentari, pregresse patologie gastrointestinali, status del paziente per infezione da H. pylori, indagini endoscopiche, patologie autoimmuni, tiroiditi o endocrinopatie, utilizzo di farmaci antisecretivi e/o FANS) e condividono le fasi della refertazione: range di riferimento, commenti interpretativi, referto finale.

Risultati: Nel primo semestre del 2009 sono stati esaminati 306 pazienti (età media $49,3 \pm 16,9$): 117 uomini ($51,0 \pm 17,7$) e 189 donne ($48,2 \pm 16,4$). Abbiamo individuato 3 classi: 176 pazienti con mucosa gastrica senza alterazioni morfofunzionali ($40 \leq \text{PgI} \leq 110 \mu\text{g/L}$ e $2,5 \leq \text{PgII} \leq 10 \mu\text{g/L}$); 81 pazienti con gastrite non atrofica ($\text{PgII} \geq 10 \mu\text{g/L}$) di cui 35 H. pylori positivi ($\text{IgG} \geq 32 \text{ U/L}$) e 46 H. pylori negativi ($\text{IgG} \leq 32 \text{ U/L}$); 22 pazienti con possibile gastrite atrofica ($\text{PgI} \leq 40 \mu\text{g/L}$) di cui 18 con probabile gastrite atrofica diffusa (valori medi $\text{PgI} 28,9 \mu\text{g/L}$, $\text{PgII} 2,9 \mu\text{g/L}$, $\text{G17} 1,4 \text{ pmol/L}$) e 4 con probabile gastrite atrofica del corpo gastrico (valori medi $\text{PgI} 26,1 \mu\text{g/L}$, $\text{PgII} 7,0 \mu\text{g/L}$, $\text{G17} 36,3 \text{ pmol/L}$).

Discussione: I livelli sierici di Pepsinogeno I e di Gastrina 17 indirizzano verso alcune condizioni di atrofia della mucosa gastrica e quindi identificano i soggetti a maggior rischio di neoplasia. Per la diagnosi di gastrite atrofica si deve escludere una causa autoimmune e/o correlazioni con patologie tiroidee. La diagnosi differenziale di maggior rilevanza è stabilire a quali soggetti consigliare l'esofagogastroduodenoscopia con biopsie multiple (EGDS).

Conclusioni: Il processo gestionale del percorso è complesso. E' fondamentale la stretta collaborazione tra clinico e laboratorista. La valutazione dei livelli sierici di questi indicatori permette ai gastroenterologi di avvalersi di un utile supporto diagnostico e di follow up da affiancare alle indagini strumentali endoscopiche.

INDICATORI SIEROLOGICI DI FUNZIONALITÀ DELLA MUCOSA GASTRICA E GASTRITE AUTOIMMUNE**E-12****A. Caleffi¹, R. Merli², C. Bonaguri¹, A. Russo¹, F. Di Mario², A. Franzè², M.T. Marino¹**¹U.O.Diagnostica Ematochimica; ²U.O.Gastroenterologia - Azienda Ospedaliero-Universitaria - Parma

Introduzione: Da anni nella diagnostica di laboratorio vengono eseguiti tests sierologici per Pepsinogeni I e II, Gastrina 17, anticorpi anti Helicobacter pylori. La valutazione comparativa di questi dosaggi (Gastropanel) fornisce suggerimenti al gastroenterologo sullo stato della mucosa gastrica con indicatori che possono anche correlare casi di gastrite cronica atrofica a patologie autoimmuni.

Scopo: Ci proponiamo di valutare i risultati degli indicatori di funzionalità della mucosa gastrica correlando i Gastropanel eseguiti nel nostro laboratorio con i dati della sierologia autoimmune.

Materiali e metodi: Nei primi sei mesi del 2009 sono state eseguiti 306 Gastropanel su siero di pazienti afferenti al Centro Prelievi della Azienda Ospedaliera di Parma. I dosaggi biochimici e il dosaggio degli anticorpi anti-Tireoperossidasi (TPO) sono eseguiti con test E.L.I.S.A, rispettivamente Biohit®, Helsinki, Finlandia/Euroclone, Milano, Italia e GenericAssays/Alifax, Italia. La determinazione degli anticorpi anti-Cellule parietali gastriche (APCA) viene effettuata in Immunofluorescenza indiretta (Alphadia/Alifax, Italia)

Risultati: I pazienti valutati sono 306 (età media $49,3 \text{ anni} \pm 16,9$): 117 uomini ($51,0 \pm 17,7$); 189 donne ($48,2 \pm 16,4$). 65 pazienti avevano richieste anche per indagini di autoimmunità; 12 per dosaggi APCA (Gastrite Autoimmune): 10 negativi e 2 positivi; 19 per ricerca di anticorpi anti-TPO (patologia autoimmune tiroidea): 13 negativi e 6 positivi. 6 pazienti APCA negativi, non in terapia con farmaci antisecretori, hanno valore medio di Pepsinogeno I di 52 microg/l e Gastrina 17 di $3,2 \text{ pmol/l}$; uno dei due pazienti APCA positivo, (donna di 42 anni, non in terapia con antisecretori, titolo 1/320), ha Pepsinogeno I di $31,1 \text{ microg/l}$ e Gastrina 17 di $20,5 \text{ pmol/l}$.

Discussione: I risultati ottenuti dagli indicatori biochimici possono correlare con varie condizioni funzionali della mucosa gastrica. Alcuni risultati del Gastropanel indirizzano verso una diagnosi differenziale con le gastriti autoimmuni.

Conclusioni: Utilizzando i dati del Gastropanel si possono ottenere approfondimenti conoscitivi sullo stato funzionale della mucosa. I livelli di Pepsinogeno I e Gastrina 17 possono orientare o meno la diagnosi verso la gastrite a etiopatogenesi autoimmune. Ci proponiamo di aumentare la casistica per meglio definire le interrelazioni tra marcatori biochimici e immunologici nell'ambito della patologia gastrica (gastrite atrofica, non atrofica, causa infettiva, non infettiva) e in quello delle Poliendocrinopatie autoimmuni. La Gastrosocopia non viene sostituita ma viene integrata da nuove interessanti informazioni.

IPOVITAMINOSI D COME FATTORE DI RISCHIO DI GASTROPATIA AUTOIMMUNE**E-13****A. Antico¹, D. Giavarina², A. Fortunato², G. Soffiati², R. Tozzoli¹, N. Bizzaro¹, L. Bacelle³**¹Gruppo di Studio Autoimmunità e Allergologia-SIMeL; ²Laboratorio Chimica Clinica ed Ematologia Ospedale di Vicenza;³Laboratorio Patologia Clinica Ospedale di Cittadella (PD)

Scopo dello studio: determinare i livelli di 25-idrossivitamina D (25-OHD) in pazienti con gastrite autoimmune (GAI), poiché lavori recenti identificano la carenza di vitamina D, ormone implicato anche nella modulazione della risposta immune, come fattore di rischio di insorgenza di malattia autoimmune in soggetti geneticamente predisposti.

Materiali e metodi: abbiamo studiato 62 pazienti con GAI (età 37-80 anni) e li abbiamo comparati con 54 soggetti con diagnosi istologica di flogosi linfocitaria gastrica aspecifica (età 20-80), 21 pazienti con gastrite multifocale da *Helicobacter pylori* (Hp) (età 20-80) e 212 soggetti di controllo (età 1-80), di cui 49 bambini con età <10 anni, arruolati tra individui a scarsa esposizione solare, con paratormone nella norma, nessuna malattia metabolica o terapia con ormone attivo. Abbiamo inoltre calcolato, impiegando il metodo statistico di Kairisto, gli intervalli di riferimento di 25-OHD nella popolazione del Nord-Est d'Italia, elaborando i dati relativi a 36.384 determinazioni effettuate su pazienti ambulatoriali di Veneto e Friuli selezionati con i criteri applicati per il gruppo di controllo. Il livello di 25-OHD, precursore circolante non attivo di 1,25-OHD, è stato dosato con metodo quantitativo in chemiluminescenza (DiaSorin, Saluggia-VC) e sono stati applicati i seguenti livelli decisionali: 25-OHD <20 ng/mL carenza; compreso tra 20-30 insufficienza; >30 livello auspicabile, secondo quanto proposto da Holick nel 2008.

Risultati: la concentrazione media di 25-OHD nella popolazione del Nord-Est è risultata $21,8 \pm 13,1$ ng/mL (intervallo di confidenza 95% [IC] 21,7-21,9); quella dei 212 soggetti di controllo $21,3 \pm 12,2$ (IC 19,7-22,9), bambini con età < 10 anni $22,9 \pm 11,3$ (IC 19,7-26,1); nei pazienti con flogosi linfocitaria gastrica aspecifica è risultata $22,2 \pm 13,5$ (IC 18,6-25,8); nei soggetti con GAI $9,8 \pm 5,6$ (IC 8,4-11,2); nei pazienti con gastrite da Hp $11,1 \pm 8,4$ (IC 7,5-14,7).

Discussione e conclusioni: i livelli di 25-OHD riscontrati nei pazienti con GAI, significativamente più bassi di quelli del gruppo di controllo e della popolazione ambulatoriale, supportano l'ipotesi, già avanzata in soggetti con LES o sclerosi multipla, che la carenza di ormone costituisca un fattore di rischio di insorgenza di malattia autoimmune in soggetti geneticamente predisposti. Il livello insufficiente di 25-OHD, presente negli abitanti del Nord-Est già dall'infanzia, potrebbe spiegare la diffusione dell'osteoporosi nella nostra popolazione. Va chiarito se la significativa ipovitaminosi D dei soggetti con gastrite da Hp correli con la gravità dell'aggressione immune della mucosa gastrica.

IL PRELIEVO DAL SENO CORONARICO: VALUTAZIONE DEL NETWORK CITOCHINICO COME MARKER DI DANNO D'ORGANO NEL PAZIENTE CARDIOCHIRURGICO**E-14****V. Ventura, G. Palmieri, M. Falbo, F. Onorati¹, A. Renzulli¹, D. Foti, E. Gulletta**Cattedra di Patologia clinica, ¹Cattedra di Cardiocirurgia, Facoltà di Medicina, Università Magna Græcia, Catanzaro

Da tempo il nostro laboratorio è orientato alla valutazione delle citochine in diverse patologie. Tra queste, grazie alla collaborazione con i cardiocirurghi, la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) che si può verificare nel corso di interventi di bypass cardiopolmonare (BCP) e di Circolazione extracorporea (CEC). In questo contesto patologico, la valutazione del profilo citochinico può essere uno strumento di supporto per la decisione clinica e nel follow-up terapeutico del paziente.

Scopo del lavoro: Abbiamo valutato il network citochinico e dei fattori di crescita su un campione prelevato dal seno coronarico durante interventi di BCP. Negli stessi pazienti sono stati analizzati i medesimi analiti nella fase pre-operatoria e fino a 48 ore dopo l'intervento.

Materiali e metodi: Sono stati arruolati in questo studio 24 pazienti sottoposti a interventi di BCP e CEC. La determinazione del network citochinico è stata effettuata su campioni di plasma ottenuti da prelievo dal seno coronarico, effettuato prima del declampaggio aortico. Negli stessi pazienti sono stati effettuati prelievi di sangue venoso periferico in un arco di 48 ore, prima, durante e dopo l'intervento (8 tempi). Il dosaggio è stato effettuato mediante il sistema "multi-analyte biochip array" (Randox laboratories) che permette di determinare simultaneamente IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL1 α , IL1 β , TNF α , IFN γ , MCP-1, VEGF, EGF.

Risultati: Le citochine IL6 e IL10 e la chemochina MCP-1 mostrano un progressivo aumento di concentrazione plasmatica, nel circolo periferico, fino al termine dell'intervento (t5) per poi diminuire (t7). Le concentrazioni delle medesime citochine nel prelievo dal seno coronarico mostrano valori fino a 10 volte superiori, rispetto al tempo corrispondente del prelievo dal circolo periferico (IL6 = 104 pg/ml; IL10 = 447 pg/ml; MCP-1 = 177 pg/ml). VEGF diminuisce fino alla fase del clampaggio aortico ed i valori dei livelli plasmatici dell'analita tra seno coronarico e circolo periferico risultano sovrapponibili.

Discussione e conclusioni: I dati ottenuti sui campioni di sangue periferico convalidano l'ipotesi secondo la quale il profilo citochinico, con la normalizzazione dei livelli dopo 24-48 ore, è fortemente indicativo dell'outcome clinico dell'intervento. La misurazione delle citochine nel prelievo, unico e non ripetibile, dal seno coronarico consente di valutare accuratamente un eventuale danno d'organo e diviene significativa per una valutazione di sequele irreversibili della procedura chirurgica e/o anestesiológica, che non si sono verificate in alcuno dei nostri pazienti.

MICROSCOPIA AUTOMATIZZATA INTELLIGENTE E CILINDRI URINARI**E-15****D. Poz, P. Cappelletti**

Patologia Clinica, AOSMA Pordenone

Premessa. Tra i vantaggi dell'utilizzo dell'iQ 200 IRIS, analizzatore di sedimenti urinari basato sul principio della microscopia automatizzata intelligente, è stato recentemente segnalato un riscontro di cilindri più frequente rispetto alla microscopia tradizionale (Clin Chem Lab Med. 2008;46:1635).

Scopo del lavoro. Verificare se l'introduzione in routine del sistema automatizzato iQ 200 abbia prodotto un incremento nella rilevazione di cilindri urinari.

Materiali e metodi. Abbiamo comparato il riscontro di cilindri negli esami urine eseguiti nel primo semestre 2005 (sedimento in microscopia tradizionale in campo chiaro) e nel primo semestre 2008 (sedimento in microscopia automatizzata intelligente), estrapolandoli dalla base di dati del nostro LIS. Per ogni periodo osservato sono state valutate la numerosità delle segnalazioni e le principali categorie di cilindri identificate (ialini, ialino-granulosi, granulosi, misti [ialino e ialino-granulosi]). E' stata anche valutata la correlazione tra la segnalazione di cilindri nel sedimento e l'albuminuria rilevata con dipstick all'esame chimico-fisico automatizzato (Aution Max AX 4280 Menarini).

Risultati. Nel 2005, su 45880 esami urine, la segnalazione di cilindri è presente in 704 campioni (1,5%), mentre nel 2008, su 46896 esami urine, in 2091 campioni (4,5%). Nel 2005 il 47% delle segnalazioni (n=331) è rappresentato da cilindri ialino-granulosi; nel 2008 il 71% delle segnalazioni è rappresentato da cilindri ialini (n=1495), I cilindri ialino-granulosi, numericamente sovrapponibili (n=353), rappresentano il 16,7% e le segnalazioni combinate di cilindri ialini e ialino-granulosi per lo stesso paziente sono il 6,5%. Nei pazienti con valori di albuminuria compresi tra 0 e 20 vi sono segnalazioni di cilindri nel 3,8% (90% ialini; 10% non-ialini); in quelli con valori di albuminuria compresi tra 30 e 150 nel 25% [range 21-30%] (71% ialini; 29% non-ialini); e in quelli con valori di albuminuria superiori a 150 nel 37% [range 32-48%] (59% ialini; 41% non-ialini);

Discussione e conclusioni. Il mix di popolazione considerato nei due semestri, stabile sia per provenienza che per prevalenza di patologia, e la numerosità del campione esaminato (circa 50.000 sedimenti per semestre) consentono il confronto tra i due gruppi. L'utilizzo di iQ200 IRIS ha triplicato il riscontro di cilindri urinari, con incremento a carico della categoria "jalini". Il numero assoluto di segnalazioni di cilindri patologici (non-jalini) è rimasto invariato. La comparazione tra l'albuminuria rilevata con il dipstick e il riscontro di cilindri urinari ha mostrato una correlazione tra il dato quantitativo e la frequenza di positività per cilindria, ma il dato chimico non può essere utilizzato per la selezione dei campioni da sottoporre a esame microscopico.

QUALE MARCATORE DI FUNZIONALITA' RENALE UTILIZZARE NELLA PROGNOSE DI PAZIENTI RICOVERATI IN UCIC?**E-16****P. Cappelletti, D. Rubin, P. Bulian, M. Cassin¹, G.L. Nicolosi¹**Laboratorio di Patologia Clinica, DML, ¹UO di Cardiologia AOSMA Pordenone

Premessa. La funzionalità renale è un determinante indipendente nella prognosi a breve e lungo termine di pazienti cardiologici ricoverati in UCIC

Scopo del lavoro. Valutare quale marcatore di funzionalità renale è da preferire nella prognosi di pazienti cardiologici acuti.

Materiali e metodi. 862 pazienti (età 26-99 anni; 28% femmine) ricoverati consecutivamente in UCIC con diagnosi NSTEMI 435, STEMI 211, miscelanea (dolore toracico, aritmie, scompenso, ecc) 116 sono stati studiati con la determinazione di eGFR con formula MDRD [$186 \times \text{creatinina (mg/dL)} - 1.154 \times \text{età} - 0.203$, per le donne i valori moltiplicati per un fattore di correzione di 0.742] e di AER (albumin excretion rate) da urine spot raccolte durante il ricovero, oltre che con i parametri normalmente utilizzati [Clin Chem 2009;55 (6 Suppl):A70].

Risultati. La distribuzione dei valori AER è log normale, con mediana 28 $\mu\text{g}/\text{mg}$, range 1-10.380, primo quartile 12, terzo quartile 147. Utilizzando 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ come cut-off, il 47% dei pazienti totali è sopra cut-off, il 48% in ST, il 43% in NST (differenza NS). eGFR ha distribuzione approssimativamente normale con mediana 83 ml/min, range 7-320, primo quartile 62, terzo 104. Utilizzando come cut-off 60 ml/min, il 25% dei pazienti ricoverati ha eGFR <60, ma il 24% nei NST e il 13% nei ST (differenza significativa). Esiste in effetti una correlazione inversa tra AER e eGFR misurata con il rho di Spearman, pari a -0.29. La concordanza tra AER>30 e eGFR<60 è 48%, le quattro celle della tabella 2x2 (righe AER, colonne eGFR) sono 380 AER <30 eGFR>60, 76 AER <30 eGFR<60, 270 AER >30 eGFR>60, 136 AER >30, eGFR<60, con chiquadro significativo. Il potere predittivo in univariata per gli eventi compositi (morte, scompenso, infarto) è simile per entrambi, con odd ratio (OR) di 3.28 per AER>30 e 3.29 per eGFR<60. Nei sottogruppi ci sono differenze: in NST AER >30 ha OR 3.35, mentre eGFR 4.57; in ST AER ha OR 3.61 e eGFR 3.29. In multivariata AER e eGFR inizialmente mostrano potere predittivo indipendente, anche aggiustando il modello con i fattori più importanti, BNP, età, FEVS, ma quando si aggiungono le copatologie, eGFR perde significatività mentre la mantiene AER, anche aggiustando ulteriormente con troponina e glicemia.

Discussione e conclusioni. I dati confermano l'importanza dei marcatori di funzionalità renale (AER, eGFR) nella prognosi di pazienti cardiologici acuti nella loro generalità e per i principali sottogruppi (NST, ST) con potere prognostico (OR) significativo. Dall'analisi multivariata AER mostra di essere un predittore anche in presenza di copatologie e a prescindere dallo stato del metabolismo glucidico.

BNP E' UN MARCATORE CARDIO-RENALE?**E-17****P. Cappelletti, D. Rubin, P. Bulian², M. Cassin¹, G.L. Nicolosi¹**Laboratorio di Patologia Clinica, DML, ¹UO di Cardiologia AOSMA Pordenone; ²CRO, Aviano

Premessa. Ancora nel 2005, Luchner et al. (Hypertension 2005;46;118-123) segnalano l'effetto moltiplicativo del danno ventricolare e di quello renale sulle concentrazioni plasmatiche dei peptidi natriuretici nei pazienti cardiologici.

Scopo del lavoro. Verificare in una popolazione afferente all'UCIC il peso relativo del danno ventricolare e di quello renale sui valori di BNP.

Materiali e metodi. 862 pazienti (età 26-99 anni; 28% femmine) ricoverati consecutivamente in UCIC con diagnosi NSTEMI 435, STEMI 211, miscellanea (dolore toracico, aritmie, scompenso, ecc) 116 sono stati studiati per il danno renale con la determinazione di eGFR con formula MDRD [$186 \times \text{creatinina (mg/dL)} - 1.154 \times \text{età} - 0.203$, per le donne i valori moltiplicati per un fattore di correzione di 0.742] e di AER (albumin excretion rate) da urine spot raccolte durante il ricovero, e per il danno ventricolare con FEVS da ecocardiografia. Il BNP è stato determinato su Advia Centaur Siemens.

Risultati. Con curva ROC è stato definito a 224 mg/L il cut-off di BNP per il potere prognostico a breve e lungo termine per end-point composito (morte, re-infarto, scompenso acuto/cronico). Nei pazienti con eGFR <60 ml/min, la percentuale di casi con BNP superiore a cut-off è 58%, mentre nei pazienti con eGFR >60 ml/min è 26% (rapporto 2.2; chiquadro <0.0001). Nei pazienti con AER >30 µg/mL, la percentuale di casi con BNP superiore a cut-off è 46%, mentre nei pazienti con AER <30 µg/mL è 23% (rapporto 2.0; chiquadro <0.0001). Nei pazienti con FEVS <40%, la percentuale di casi con BNP superiore a cut-off è 81%, mentre nei pazienti con FEVS >40% è 28% (rapporto 2.9; chiquadro <0.0001). Le correlazioni con il rho di Spearman sono rispettivamente -0.44, -0.29, -0.46. Nei pazienti con eGFR <60 ml/min e FEVS <40%, la percentuale di casi con BNP superiore a cut-off è 77%, mentre nei pazienti con eGFR >60 ml/min e FEVS >40% è 31% (rapporto 2.5; chiquadro <0.0001). Nei pazienti con AER >30 µg/mL e FEVS <40%, la percentuale di casi con BNP superiore a cut-off è 73%, mentre nei pazienti con AER <30 µg/mL e FEVS >40% è 32% (rapporto 2.1; chiquadro <0.0001).

Discussione e conclusioni. Il danno renale (valutato con eGFR e AER) e il danno ventricolare (valutato con FEVS) sono determinanti indipendenti del valore plasmatico di BNP. La combinazione dei due tipi di danno moltiplica per circa 2.5 la probabilità di trovare nei pazienti un BNP sopra il cut-off stabilito con curva ROC. Tuttavia FEVS rappresenta il fattore predominante con un aumento di probabilità di BNP plasmatico sopra il cut-off di 224 mg/L nei pazienti pari a 2.9.

CONTRIBUTO DELL'AUTOMAZIONE NEL RICONOSCIMENTO DI CELLULE ATIPICHE NELLE URINE**E-18****R. Anderlini, F. Torricelli, G. Patelli, R. Tarozzi, N. Lelli, A. Mucci, O. Raisi, A.M. Cenci**

Dip.Pat.Clin. e Corelab NOCSAE-AUSL Modena

Introduzione: Si conosce come possibile il ritrovamento casuale nel sedimento di cellule atipiche provenienti dalle vie urinarie. Strumenti automatizzati, a cattura e archiviazione di immagini possono offrire in questi casi utili occasioni di approfondimento.

Scopo del lavoro: 1) suggerire la raccolta per citologia urinaria in urine da test standard automatizzato con riscontro casuale di cellule "sospette" (non da ultime vie o atipiche); 2) provare compatibile materiale da vials citologici per strumenti automatizzati in fase liquida, rendendo così utilizzabili per la formazione degli operatori del laboratorio i campioni da citoteca liquida di pazienti condivisi.

Materiali e metodi: Indagine condotta con IRIS iQ200, IL, a microscopia computerizzata, fotografia e digitalizzazione software APRTM (Auto-Particle Recognition): classificazione delle immagini per dimensione, forma, contrasto, contenuto interno con rete neurale altamente specializzata, ordinamento e visualizzazione in categorie automatiche. Elementi non ben ascrivibili a categorie previste sono revisionati dagli operatori a video e/o al MO (campo chiaro, 400x). Lo studio, in corso, considera: 1) urine da portatori conosciuti di k vescica (tipo istologico, infiltrazione e terapie diversi, in diagnosi e/o in follow up), in vials citologici e, dopo diluizione con IRIS Diluent, sottoposti ad esame strumentale; 2) urine fresche random dalla routine interna (4 ospedali) ed esterna (tutta la provincia). Sono state così esaminate (giugno e agosto 2009; pazienti di entrambi i sessi dai 9 agli 88 anni: 16 urine da vials conservati per K vescica (8 per displasia grave; 2 post-operati, 6 per atipie in via di definizione); 28 random dalla routine che, poste in tampone subito dopo osservazione, sono state inviate a citodiagnosi.

Risultati: Nelle urine random il fermo ha ipotizzato 6 displasie (conferma anamnestiche e/o su campione in vial), 2 nuovi k vescica pre-intervento e 1 vescica colica post-intervento, da controllo periodico. Alcuni fermi sono legati alle difficoltà strumentali di riconoscimento di cellule delle basse vie genito-urinarie femminili (in particolare in 2 casi di amenorrea secondaria ed 1 pubertà precoce), ed ad alcuni casi di presenze anomale in urine da catetere.

Discussione e conclusioni: L'esperienza, preliminare e positiva, traccia un percorso per interpretare cellule "non normali" nelle urine per esame standard (es: "da catetere") o suggerisce nelle atipie, approfondimenti motivati, interdisciplinari per accelerare le diagnosi. Un simile approccio in automazione si potrebbe ipotizzare come su urine in qualche altro campo diagnostico di citologia esfoliativa, garantendo tracciabilità ed archiviazione immagini particolarmente utili nei follow up.

CONTRIBUTO DELL'ANALISI CITOFLUORIMETRICA ALLA DETERMINAZIONE DELLO STATO DI SEPSI: ESPRESSIONE DI CD64 NEI NEUTROFILI

E-19

M. Calarco¹, E. Romiglio¹, A. Regazzoli¹, F. Busi¹, P. Barbieri¹, G. Montini¹, B. Milanese²

¹° Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia – Spedali Civili di Brescia

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio – A.O. di Desenzano d/G (Bs)

Scopo del lavoro: la sepsi è una patologia sistemica che nei neonati rappresenta una causa importante di mortalità e morbilità. Poiché le prime manifestazioni cliniche delle infezioni sono generalmente non specifiche, nasce la necessità di possedere indagini di laboratorio altamente sensibili oltre a quelle già utilizzate: emocromo, CRP, rapporto granulociti I/T ed emocoltura. L'utilizzo della citofluorimetria a flusso ha permesso di studiare il dosaggio quantitativo di CD64 come indicatore precoce di sepsi neonatale.

Materiali e metodi: il dosaggio di CD64 viene eseguito su campioni di sangue con EDTA_K3 di neonati ricoverati nei 4 reparti dell'area neonatale. In un periodo di 60 giorni sono stati analizzati 233 campioni accompagnati da una scheda indicante le notizie cliniche del neonato. I pazienti sono stati suddivisi in 4 gruppi: assenza di patologie, sepsi provata da emocoltura positiva, sepsi sospetta o clinica e altre condizioni non correlate a stato settico. Sono stati testati anche campioni di sangue prelevati da soggetti sani adulti, per la verifica dei settaggi strumentali e per l'elaborazione di intervalli di riferimento. Per la misura dell'espressione di CD64 è stata utilizzata una miscela di 3 anticorpi monoclonali, il clone 22 e 32.2 di CD64 e il clone Mac2-158 di CD163 ed una sospensione di biglie marcate con tre fluorocromi.

Risultati: i risultati sono espressi come "CD64 index": numero puro derivato dal rapporto tra segnale di MFI (indice di fluorescenza media) dei neutrofilo e la corrispondente lettura rilevata per il cluster delle biglie. I bambini sono stati stratificati in base ai giorni di vita, al tipo di parto ed al reparto di provenienza. L'analisi statistica dei dati ha permesso di elaborare gli intervalli di riferimento, considerando normali soggetti presentanti un valore inferiore o uguale al 95° centile.

Nei soggetti sani adulti si riscontrato un valore soglia ≤ 0.97 , mentre la popolazione neonatale ha mostrato valori di CD64 index più elevati, con un cut-off pari a 2.13 in prima giornata.

Conclusioni: La metodica si è dimostrata efficace per differenti anticoagulanti, l'espressione di CD64 è stabile a temperatura ambiente per 24 ore e a 2/8°C per 48 ore. La seduta analitica è rapida: 45 min per la preparazione del campione e 10 min per l'acquisizione con il citofluorimetro. La possibilità di produrre una misura citofluorimetrica quantitativa è di estrema importanza per la confrontabilità dei dati prodotti con strumentazioni diverse, ed il monitoraggio dell'andamento temporale dell'espressione di CD64.

SERUM AND URINE TRYPSINOGEN ACTIVATION PEPTIDE IN ASSESSING POST-ERCP PANCREATIC DAMAGE

E-20

G.V. Melzi d'Eril¹, R. Pezzilli², A. Mariani³, A. Gabbrielli⁴, A.M. Morselli-Labate², A. Barassi¹

¹Department of Medicine, Surgery and Dentistry, University of Milan, San Paolo Hospital, Milan; ²Department of Digestive Diseases and Internal Medicine, S.Orsola-Malpighi Hospital, Bologna; ³Gastroenterology and Digestive Endoscopy Unit, San Raffaele Hospital, Milan; ⁴Digestive Endoscopy Unit, Campus Biomedico, Rome

Aim of the study. The primary end-point of this study was to evaluate the serum trypsinogen activation peptide (TAP) concentration elevation after Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography (ERCP) and to establish its role in the early diagnosis of post-procedural acute pancreatitis (AP). As secondary end points, our aim was to explore whether the administration of gabexate mesylate (GM), a potent protease inhibitor, could prevent the activation of trypsinogen by blocking trypsin activation and then be capable of reducing the levels of TAP in serum as well as in urine.

Patients and methods. Seventy-five patients were enrolled in the study and 81.3% of them received GM. Post-procedural mild AP developed in 13 patients (17.3%) (19.7% of patients who received GM and 7.1% of those who did not; P=0.440). Serum and urine TAPs were assayed using a technique previously described [Pancreas 2004;29:298-305]. The detection limit was 1.0 ng/mL and healthy subjects had no detectable values of TAP in serum and in urine. Serum trypsinogen concentrations were determined using commercially available RIA-kits (Trypsik, Sorin Biomedica, Italy). The detection limit was 2.5 ng/mL and the reference values of our laboratory were 10-57 ng/mL.

Results. In the 65 patients who completed the study, 2-hour post-ERCP serum TAP concentrations were elevated (P=0.034 vs. pre-ERCP) whereas these concentrations significantly declined at 4 hours (P=0.006). Urine TAP showed a similar behavior. Mean serum trypsinogen concentrations were slightly below the upper reference limit before ERCP and then significantly increased thereafter. Serum and urine TAP levels, as well as serum trypsinogen concentration, showed no significant differences between patients who developed AP and those who did not. Within the group of the patients who received gabexate mesylate, serum TAP concentrations were significantly lower at 1 and 2 hours after ERCP in the patients who developed AP (P=0.033 and P=0.041, respectively).

Conclusions. Serum and urine concentrations of TAP are detectable very early in patients who undergo ERCP examination, i.e. within the first 6 hours. TAP determination is of limited value in assessing pancreatic damage.

EFFETTI POST-INFUSIONALI DELL'INFLIXIMAB E DELL'ABATACEPT SUL METABOLISMO DEL CALCIO IN PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE REUMATOIDE

E-21

M. Infantino¹, C. D'Asero¹, E. Bizzi², U. Massafra², A. Migliore²

¹Laboratorio di Patologia Clinica, ²U.O. Semplice Clinica Reumatologica - Ospedale S.Pietro-Fatebenefratelli, Roma

Scopo del lavoro. L'avvento dei farmaci in grado di bloccare il tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ha migliorato la qualità di vita dei pazienti affetti da artrite, riducendo in modo significativo l'infiammazione articolare, la progressione della malattia. Lo scopo della presente ricerca è stato quello di valutare se la terapia con farmaci biologici, in particolare Infliximab e Abatacept (Orencia), possa influenzare il metabolismo osseo; in particolare si è focalizzata l'attenzione sul momento acuto dell'infusione in pazienti affetti da A.R. e si sono analizzati i cambiamenti postinfusionali dal punto di vista biochimico-clinico nel metabolismo del calcio in questi pazienti.

Materiali e metodi. Lo studio, in aperto, è stato condotto su un gruppo di 48 pazienti con diagnosi di AR seguiti presso l'U.O. Semplice Clinica Reumatologica del Dipartimento di Medicina dell'Ospedale S.Pietro, che assumevano terapia stabile con Infliximab (32 pazienti) o Abatacept (16 pazienti) da almeno sei mesi, nel periodo compreso tra ottobre 2008 e maggio 2009.

Risultati. La concentrazione sierica del calcio è risultata diminuita in modo statisticamente significativa dal tempo pre-infusionale (media 9.34 ± 0.54 DS) al tempo post-infusionale (media 8.67 ± 0.74 DS) nei pazienti in trattamento con Infliximab ($P=0.0002$) e non ha subito modificazioni significative dal tempo preinfusionale (media 9.92 ± 1.12 DS) al tempo postinfusionale (media 9.35 ± 0.67 DS) in quelli trattati con Abatacept ($P=0.1212$, ns). La concentrazione della fosfatasi alcalina (ALP) è risultata diminuita in modo statisticamente significativa dal tempo preinfusionale (media 78.11 ± 27.95 DS) al tempo postinfusionale (media 70.22 ± 26.80 DS) nei pazienti in trattamento con Infliximab ($P=0.001$) ed è risultata diminuita dal tempo preinfusionale (media 80.87 ± 30.32 DS) al tempo postinfusionale (media 75.37 ± 28.24 DS) anche nei pazienti in trattamento con Orencia ($P=0.01$). Non abbiamo osservato modificazioni significative dei livelli sierici del fosforo e del PTH, in accordo con la necessità di un maggiore numero di ore per attivare i meccanismi coinvolti nella loro sintesi.

Conclusioni. L'infiammazione cronica e la perdita di densità ossea sono due fenomeni strettamente legati. I risultati preliminari della nostra ricerca documentano gli effetti determinati dalla terapia con farmaci ad azione anti TNF- α sui parametri del metabolismo osseo in fase precoce immediatamente dopo l'infusione. È interessante notare come farmaci con un meccanismo farmacologico molto diverso, l'uno anti-TNF α e l'altro immunosoppressore selettivo, abbiano un effetto diverso nella riduzione della calcemia e nel metabolismo del calcio: una spiegazione parziale consiste nel fatto che il secondo farmaco ha effetti anti-TNF- α solo indiretti essendo l'Abatacept un immunomodulatore selettivo per il segnale chiave di costimolazione mentre i farmaci anti TNF- α (Infliximab) hanno un legame stretto e immediatamente forte con il TNF- α tale da poter spiegare la drastica riduzione della calcemia. I nostri dati dovranno essere confrontati con gli effetti a lungo termine della terapia con l'Infliximab sul metabolismo osseo. L'esiguo numero di pazienti non permette di chiarire completamente il ruolo che l'Abatacept svolge sul magnesio e se il riscontro di diminuiti livelli dopo l'infusione di tale farmaco possa essere dovuto all'azione della molecola; sarà necessario un numero maggiore di pazienti per confermare tali risultati.

E' L'IPERCALCEMIA UN PROBLEMA CLINICO?

E-22

P. Cappelletti, P. Metus, A. Picierno

Patologia Clinica, DML, AOSMA Pordenone

Premessa. L'ipercalcemia, definita come un aumento del calcio totale sierico (tCa) $\geq 10,5$ mg/dL, riconosce cause clinicamente classificabili come PTH-dipendenti (iperparatiroidismi), più frequenti nei pazienti ambulatoriali, e PTH-indipendenti (in primo luogo in corso di neoplasia), più frequenti nei pazienti ospedalizzati. La misura del calcio ionizzato (iCa) elimina il dubbio di pseudoipercalcemia. La misura del PTH sierico permette di differenziare le cause di ipercalcemia, ma deve essere interpretata alla luce dei valori di vitamina D 25OH (D3).

Scopo del lavoro. Verificare se e quali indagini laboratoristiche di approfondimento hanno fatto seguito al riscontro di ipercalcemia.

Materiali e metodi. Sono stati estratti dal nostro archivio informatico i risultati relativi alle determinazioni di tCa ≥ 10.5 mg/dL, del PTH, della D3 e di iCa, eseguite in pazienti afferiti presso il nostro laboratorio nell'arco di 12 mesi. Dopo aver applicato su questa base-dati una funzione di aggregazione parametrata sull'identificativo paziente, onde evitare di considerare le ripetizioni d'esame (monitoraggio), è stato valutato se sul singolo soggetto l'ipercalcemia rilevata fosse accompagnata o meno da misure di PTH, di D3 e di Ca ione e la provenienza dei pazienti.

Risultati. Ca ≥ 10.5 totali, N=2450; Ca > 10.5 e PTH: 9,1%; Ca > 10.5 , PTH e D3: 4%; Ca > 10.5 , Ca ione e PTH: 1,4%; Ca > 10.5 , Ca ione, PTH e D3: 2,7%. Per quanto riguarda il numero degli approfondimenti (PTH, D3 e iCa) in corso di ipercalcemia è risultato che le richieste provengono nell'ordine dal reparto di nefrologia (20%), ortopedia e divisioni di medicina generale.

Discussione e conclusioni. L'80% delle ipercalcemie non vengono approfondite. La determinazione di iCa, che dovrebbe essere considerata fondamentale nella valutazione di un'ipercalcemia sia per la sua definizione (ipercalcemia vera?) sia come indice dell'eventuale insorgenza di una sintomatologia acuta, non viene richiesta se non in un piccolo numero di casi (su 3370 tCa > 10.5 mg/dL soltanto 680 iCa). Viste le ripercussioni dell'ipercalcemia cronica a medio e lungo termine a livello renale (nefrolitiasi) e scheletrico (osteoporosi), non sorprende che i nefrologi siano i richiedenti maggiori e maggiormente appropriati (PTH e D3). In sintesi dal nostro studio emerge come l'ipercalcemia risulti un problema clinico sottovalutato al di fuori dell'ambito nefrologico.

CAUSE GENETICHE DI INFERTILITA'**F-01****S. Vaccarella, M.G. Caputo, M. Medaglia, D. Scarpelli, S. Tozzi, M. Vitiritti**

Azienda Ospedaliera Cosenza

Scopo. Valutazione della presenza di cause genetiche in soggetti affetti da infertilità.*Metodi.* Dalla nostra casistica sono stati selezionati: N. 176 coppie con infertilità da almeno 2 anni di rapporti non protetti; N. 118 coppie con almeno due aborti; N. 12 maschi affetti da azoospermia. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad analisi del cariotipo eseguita su sangue periferico secondo le linee guida della SIGU. Nei soggetti affetti da azoospermia è stata effettuata, in aggiunta, la ricerca delle microdelezioni del cromosoma Y (Metodo RhyMA-TEST IVF, Human Diagnostic) e di mutazioni del gene della fibrosi cistica (Metodo INNO-LiPA CFTR, Innogenetics).*Risultati:* L'analisi citogenetica condotta sulle 176 coppie infertili ha evidenziato la presenza in 3 coppie (1.7%) di cariotipi alterati, in particolare in due maschi e in una femmina: un maschio presentava una traslocazione Robertsoniana tra i cromosomi 13 e 14, 45, XY t(13; 14) (q10; q10) e l'altro una traslocazione reciproca tra i cromosomi 15 e 16 apparentemente bilanciata 46 XY, t(15; 16) (q13; q24); la femmina è risultata portatrice di una monosomia del cromosoma X presente in mosaicismo 46, XX[90%]/45, X [10%]. Tra le 118 coppie con almeno 2 aborti, sono stati riscontrati in 3 coppie (2.54%) la presenza di cariotipi alterati, in particolare in due femmine e in un maschio. Nelle due femmine era presente una monosomia del cromosoma X in mosaicismo: in un caso il cariotipo era 46,XX [90%]/45,X [10%], nell'altro 46, XX[94%]/45,X [6%]. Nel maschio l'analisi citogenetica ha, invece, evidenziato la presenza di una traslocazione apparentemente bilanciata che interessava i cromosomi 3 e 4, 46, XY t(3; 4) (q25; q21). Questi dati sono statisticamente significativi rispetto alla popolazione generale considerando che la frequenza delle traslocazioni reciproche e Robertsoniane sono pari allo 0.1% e quella relativa alla Turner è pari allo 0.02%. Fra i 12 casi di azoospermia, inoltre, sono stati rilevati 2 casi (16,7%) con cariotipo 47, XXY. In un caso (8,3%) è stata riscontrata la microdelezione del cromosoma Y. La ricerca delle mutazioni sul gene della fibrosi cistica ha evidenziato, in un maschio (8,3%), la presenza di una mutazione missense in omozigosi a livello dell'amminoacido 1303 (N1303K) e del polimorfismo 7T/9T.*Conclusioni:* I risultati ottenuti dimostrano una associazione significativa tra aberrazioni cromosomiche e disturbi della riproduzione. Sono rilevanti le cause genetiche (25%) fra i soggetti affetti da azoospermia. Ulteriori indagini sono in corso sul paziente portatore della mutazione N1303K al fine di rilevare l'eventuale presenza di agenesia dei dotti deferenti.**ANALISI MOLECOLARE DELL'ESPRESSIONE BIALLELICA COMPARATIVA RELATIVA DEL GENE DEL RECETTORE DEL TROMBOSSANO (TBXA2R) PER IL POLIMORFISMO C924T****F-02****E. Toniato², C. Di Rico², S. Ursi¹, G. Vitullo¹, A. Tavella², S. Matera¹, A. Di Muzio³, A. Poliandri⁴, V. Dolo⁴, M.R. Flacco², V. Flati³, F. Cipollone², S. Martinotti^{1,2}**¹Unità di medicina predittiva e diagnostica molecolare policlinico universitario "SS. Annunziata" Chieti; ²Università degli Studi "G.D'Annunzio" Chieti; ³Università di L'Aquila Biotecnologie; ⁴Università di L'Aquila Dipartimento di Medicina Sperimentale*Scopo:* L'investigazione di possibili meccanismi post-trascrizionali del tratto polimorfico C924T sulla porzione "untranslated" 3' del gene del recettore del trombossano (TBXA2R).*Materiali e Metodi:* Abbiamo analizzato l'espressione biallelica di TBXA2R su RNA estratto di una linea cellulare linfocitaria Marmoset B-95.8 (ATCC) eterozigote (CT) per la variante C924T. Le cellule sono state trattate con actinomicina D per bloccare l'attività trascrizionale del gene e analizzare in tempi diversi l'espressione biallelica comparativa residua, funzione del tur-over dei due trascritti rispetto alla variante C924T. Dose Response con Actinomicina D: Per verificare l'effetto di concentrazioni crescenti (1µM-5µM-10µM-15µM-20µM) di Actinomicina D (Sigma Aldrich, soluzione madre 1mM in etanolo) sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare, le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (2x10⁵ cellule/2mL terreno completo/pozzetto) e contate con la camera di burker dopo colorazione con il trypan blue, a differenti intervalli di trattamento: T0h-T1h-T2h-T3h-T6h-T24h. Trattamento delle cellule con Actinomicina D ed estrazione dell'RNA: Le cellule, seminate il giorno prima in piastre Petri per colture da 100mm (8x10⁶ cellule/10mL terreno completo/piastra), sono state trattate con Actinomicina D alla concentrazione finale 10µM e, a differenti tempi d'incubazione (T0h-T1h-T2h-T3h-T6h-T9h-T12h-T24h) sono state lavate due volte con PBS senza Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ e lisate direttamente nella piastra con 1 mL di TRIZOL® Reagent. I campioni lisati sono stati raccolti in vials da 2mL (RNase-free) e l'estrazione dell' RNA è stata completata secondo il protocollo fornito dal produttore (Invitrogen).*Risultati:* Dopo analisi per RealTime-PCR dell'espressione comparativa dei trascritti TBXA2R relativi all'incorporazione della variante C o T nella porzione 924 untranslated, è stato dimostrato che il rapporto dell'espressione differenziale è a vantaggio della variante C rispetto a T, che l'espressione genotipica T determina una minore espressione e una alta instabilità del trascritto, correlando l'efficienza e la funzionalità del recettore del trombossano in funzione dell'espressione specifica del tratto polimorfico.*Conclusioni:* La sintesi di questo studio mira ad avvalorare la significatività di tale polimorfismo, che riguarda una porzione 3'UTR (UnTranslated Region) dell'mRNA del gene TBXA2R. Questa variante, essendo stata associata a significatività clinica rispetto a numerosi studi presentati, avvalorata l'ipotesi che il sito polimorfico sia un punto importante per la regolazione pos-trascrizionale e la stabilità del trascritto. Di conseguenza la concentrazione di prodotto attivo ne sarebbe altamente influenzata, determinando variazioni fenotipiche.

VALUTAZIONE DELLA VIREMIA IN UN GRUPPO DI PAZIENTI AFFETTI DA EPATITE DA VIRUS C: CONFRONTO TRA DUE METODI DI PCR

F-03

A. Ferrini¹, M. Bongera¹, F.I. Peretti¹, R. Rizzi²

¹Dipartimento di Patologia Clinica ASL TO4 Ivrea; ²S.C. Gastroenterologia ASL TO4 Ivrea

Scopo del Lavoro: Valutare se, in un gruppo di pazienti trattati per infezione da HCV, l'uso di un test più sensibile può migliorare il Valore Predittivo Negativo per gli SVR (Risposta Virologica Sostenuta) e verificare la corretta assegnazione allo stato di Relapser (Risposta Transitoria con Riattivazione dopo Terapia) degli altri soggetti.

Materiali e Metodi: Sono stati ripetuti, con metodica Amplicor/Cobas Taqman (Roche), 53 campioni, prelevati al termine del ciclo terapeutico (secondo le linee guida A.I.S.F.2008), di pazienti con infezione da HCV precedentemente processati con metodica Cobas Amplicor (Roche) e classificati come SVR (6 di questi erano poi risultati essere dei Relapser).

Risultati: 47 campioni, sono stati riconfermati come negativi. Dei 6 pazienti classificati come Relapser, 4 campioni non hanno rivelato presenza di viremia (confermando i risultati precedenti), un campione ha dato esito positivo ed un altro è risultato Below Range (HCV RNA rivelato ma inferiore a 15 UI/ml).

Discussione e Conclusioni: La metodica Amplicor/Cobas Taqman (Roche) sembra poter garantire una più sicura discriminazione dei veri Relapser consentendo al clinico l'applicazione degli opportuni protocolli terapeutici. Sarà opportuno valutare nel tempo e su una casistica più ampia il reale significato dei campioni Below Range.

T1DM E CELIACHIA: DOT-BLOT PER UN FLASH IMMEDIATO DI UN GENOTIPO DI RISCHIO COMUNE

F-04

G. Amato, R. Mogavero, F. Cardella, G. Ciofalo, M. Di Pisa, F. Lombino, M. Salvia, L. Bianchi, S. De Michele, J. Tusa, B. Palma

A.O.R.N.A.S. Civico–DiCristina–Benfratelli–Palermo; P.O. Civico - U.O.C. Patologia Clinica–Laboratorio di Immunobiologia e Citofluorimetria; P.O. DiCristina - U.O.C. IV Pediatria

Scopo del lavoro – L'associazione tra Celiachia (MC) e Diabete di tipo1 (T1DM) è valutata intorno al 2–16% . Un chiarimento parziale di tale associazione sta nella peculiarità del loro immunogenotipo, con entrambe le malattie associate a trasmissione ereditaria di determinati alleli HLA di classe II. Il nostro obiettivo è stato quello di utilizzare un sistema biomolecolare con amplificazione mediante PCR ed ibridazione mediante reverse dot – blot che consentisse di analizzare simultaneamente la presenza dei genotipi HLA predisponenti sia al T1DM che alla MC in pazienti con T1DM all'esordio per valutarne i possibili vantaggi applicativi.

Materiali e metodi – Sono stati analizzati i genotipi HLA di classe II di 100 pazienti della IV Pediatria del P.O. "G. Di Cristina" che presentavano un esordio di T1DM confermato clinicamente. I prelievi di questi pazienti sono stati inviati ed analizzati presso il Laboratorio di Immunobiologia e Citofluorimetria dell'U.O.C. di Patologia Clinica del P.O. "Civico". Sono stati utilizzati il kit Zöliakie DQ2+DQ8 Typing ed il kit HLA-Risikoallele für IDDM (della Autoimmun Diagnostica GmbH distribuiti dalla PANTEC di Torino) che permettono la ricerca dei genotipi di rischio per le due patologie utilizzando una tecnica in dot-blot su striscia di cellulosa mediante ibridazione inversa. I test per il genotipo di MC e T1DM sono stati eseguiti in un'unica seduta analitica e interpretati successivamente con un apposito software.

Risultati – Il 68% dei pazienti pediatrici con T1DM all'esordio, confermato clinicamente e valutato geneticamente, possedeva un genotipo DQ2 e/o DQ8 predisponente alla MC. La tecnica utilizzata, con cui sono stati valutati i genotipi predisponenti alle due malattie, ha consentito di effettuare entrambi i test in un'unica seduta analitica ed ha permesso la raccolta e la conservazione di una documentazione cartacea dei test eseguiti.

Discussione e conclusioni – Secondo recenti studi (Dezsofi–JPGN 2008;47:284-7), un genotipo DQ2 e/o DQ8 è presente nell'80% dei pazienti con T1DM. La presenza di genotipo predisponente alla MC se non è sufficiente a determinarne l'insorgenza può identificare un fattore di rischio di cui tenere conto per la prevenzione della MC, consentendo di mettere in atto un'opportuna strategia di monitoraggio, nel paziente con T1DM, del suo esordio e di attuare le scelte terapeutiche appropriate.

RICERCA DELLA MUTAZIONE V617F DEL GENE JAK2 MEDIANTE PCR REALTIME SU SANGUE IN TOTO

F-05

D. Campioli, L. Simoni, V. Chiarenza, A. Pastore, P. Zucchini¹, R. Marasca¹

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche; ¹Ematologia - Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Modena

Scopo del lavoro: La mutazione somatica V617F del gene JAK2 è una importante caratteristica genetica delle sindromi mieloproliferative croniche (SMPC) BCR/ABL negative. E' presente in circa il 90 % delle Policitemie Vere e nel 50 % delle Trombocitemie Essenziali e Mielofibrosi Idiopatiche. Scopo del nostro lavoro è stato valutare la affidabilità di un metodo per la ricerca di tale marcatore molecolare utilizzando una metodica di PCR Real Time su sangue "in toto" rispetto ad un metodo precedentemente in uso: PCR Allele-Specifica su concentrati granulocitari (AS-PCR).

Materiali e metodi: Abbiamo esaminato 40 campioni di sospette SMPC BCR/ABL negative provenienti dagli ambulatori o dal day hospital dell'Ematologia di Modena. I campioni riguardavano 37 pazienti; di tutti abbiamo ricevuto il sangue periferico; di 3 pazienti abbiamo ricevuto anche il sangue midollare. I prelievi erano conservati in provette con anticoagulante (33 campioni: sodio citrato 3.8%, 7 campioni: K3EDTA) e mantenuti a -20°C fino al momento dell'analisi. La ricerca è stata condotta con due metodiche per la determinazione qualitativa della mutazione: 1) PCR Allele-Specifica e successiva elettroforesi su gel di agarosio al 2%. 2) PCR Real Time con kit commerciale della Nanogen Advanced Diagnostics (TaqMan Allelic Discrimination Assay su strumentazione: ABI Prism 7300 della Applied Biosystem). L'analisi mediante AS-PCR è stata eseguita presso il laboratorio di Ematologia, come riportato da Baxter EJ et al (Lancet 2005,365:1054-61), utilizzando il DNA estratto da concentrati granulocitari. La PCR Real Time è stata condotta, secondo le indicazioni del produttore, su sangue "in toto", senza alcuna preparazione preventiva. Le indagini sono state eseguite in due diversi laboratori, in doppio cieco e i risultati sono stati confrontati solo successivamente.

Risultati: Abbiamo ottenuto una concordanza del 100% dei risultati forniti dai due metodi: 19 campioni presentavano la mutazione; 21 risultavano normali. Anche in due casi in cui i risultati erano positivi al limite delle sensibilità delle due metodiche, l'interpretazione finale è stata la medesima.

Discussione e conclusioni: La assoluta concordanza dei risultati ottenuti con i due metodi ci ha consentito di adottare con totale tranquillità il metodo valutato che presenta rispetto al precedente alcuni evidenti vantaggi: la facilità di utilizzo, ridotti tempi di esecuzione, disponibilità di un Kit con certificazione CE e soprattutto la possibilità di eseguire la ricerca su sangue in toto semplificando notevolmente la preparazione dei campioni.

IDENTIFICAZIONE E GENOTIPIZZAZIONE DEL HPV DNA E RNAm TEST SU CAMPIONE CERVICALE IN UNA POPOLAZIONE NON SELEZIONATA AFFERENTE ALL'OSPEDALE FATEBENEFRAPELLI ISOLA TIBERINA DI ROMA

F-06

M. Rongioletti¹, F. Papa¹, T. Melillo¹, V. Panetta², C. Vaccarella¹, S. Selvaggini¹, B. D'Andrea¹, S. Cesaretti¹, G.M. Liumbruno¹

¹Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale "San Giovanni Calibita" Fatebenefratelli Roma

²Statistica Medica & Information Technology Associazione fatebenefratelli per la Ricerca (AFAR), Roma

Scopo del lavoro: Numerosi studi epidemiologici, clinici e di biologia molecolare hanno evidenziato che la maggior parte dei tumori della cervice sono associati ad un'infezione da papillomavirus (HPV). L'infezione persistente e la trasformazione in senso neoplastico delle cellule della cervice uterina avviene in seguito all'integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite ed alla produzione di due proteine con attività oncogenica, E6 ed E7, necessarie sia per l'induzione che per il mantenimento del tumore. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la frequenza di positività al test dell'HPV-DNA e dell'mRNA per gli oncogeni E6/E7 e la frequenza dei genotipi coinvolti.

Materiali e Metodi: 961 campioni sono stati testati per HPV-DNA screening e tipizzazione (Innogenetics, N.V. Belgio); su 327 campioni è stata valutata anche l'espressione dell'mRNA degli oncogeni E6 e E7 di HPV per i genotipi 16, 18, 31, 33, e 45 con il kit HPV-Nuclisens EasyQ (Bio Merieux), che utilizza la tecnica NASBA in real time.

Risultati: Sono risultati positivi al DNA test 441 campioni con una frequenza di positività pari al 45,8%. 36 campioni sono risultati positivi anche al test per mRNA. I 4 genotipi HPV più frequentemente isolati sono stati il 16,51,53,31 (rispettivamente 16%, 11%, 10%, 11%). Al test per l'mRNA, l'HPV 16 si è rivelato il più frequente con 22 campioni positivi (61%).

Discussione e conclusioni: L'HPV 16 è risultato essere il genotipo più frequentemente isolato sia al test per la ricerca del DNA che per mRNA. Per quanto riguarda l'HPV 18, il suo isolamento si conferma, in accordo con altri lavori pubblicati e contrariamente a quanto riportato in altri paesi europei, poco frequente (~2%). L'analisi dei dati documenta una non congrua richiesta del test per l'mRNA in donne con DNA positivo per genotipi a basso o medio rischio. Tale comportamento porta ad un inutile incremento della spesa alle donne senza aggiungere informazioni clinicamente rilevanti.

SCREENING PER LE MUTAZIONI DEL GENE CFTR (CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE REGULATOR GENE) IN 3.578 PAZIENTI INFERTILI CANDIDATI PER TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA E RELAZIONE TRA LE MUTAZIONI CFTR, IVS8-POLYT E MICRODELEZIONI DEL CROMOSOMA Y IN MASCHI AZOOSPERMICI

F-07

M. Rongioletti¹, F. Papa¹, M. Cortesi¹, L. Bonito¹, V. Panetta², C. Vaccarella¹, T. Melillo¹, B. D'Andrea¹, P. Scotaccia¹, S. Cesaretti¹, G.M. Liunbruno¹

¹Laboratorio di Patologia Clinica, Sezione di Biologia e Genetica Molecolare" Ospedale San Giovanni Calibita" Fatebenefratelli, Roma, Italia

²Medical Statistics & Information Technology Fatebenefratelli Associazione per la Ricerca AFAR, Roma, Italia

Introduzione. In letteratura è stata ipotizzata l'associazione tra le mutazioni del gene CFTR e l'infertilità maschile e femminile. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare la frequenza delle mutazioni del gene CFTR in un gruppo non selezionato di pazienti candidati per tecniche di riproduzione assistita e la relazione tra la mutazione IVS8-polyT e le microdelezioni del cromosoma Y in maschi azoospermici.

Metodi. 3578 pazienti (2139 femmine e 1439 maschi) sono stati analizzati per 53 mutazioni CFTR e per il polimorfismo IVS8-polyT con tecnica PCR Multiplex (INNO-LiPA CFTR); in 117 maschi azoospermici sono state studiate le microdelezioni del cromosoma Y con PCR multiplex (ABanalitica). Sia per gli uomini che per le donne è stata calcolata la frequenza delle mutazioni. Il test del Chi-quadrato è stato utilizzato per il confronto delle frequenze. Solo i valori di p minori di 0.01 sono stati considerati significativi.

Risultati. Le mutazioni CFTR sono state riscontrate nel 3.8% dei soggetti. La mutazione più frequente è la $\Delta F508$ (del/N), osservata nel 1.19% dei pazienti. Il polimorfismo IVS8-polyT ha evidenziato una frequenza del 71.5% per gli alleli 7T/7T, del 19.1% per gli alleli 7T/9T e solo del 0.31% per gli alleli 5T/5T. Solo 1 dei 117 pazienti azoospermici presentava una delezione per il cromosoma Y ed era negativo per le mutazioni CFTR, mentre in 4 dei 117 pazienti azoospermici era presente in eterozigosi una mutazione CFTR. Per quanto riguarda il polimorfismo IVS8-polyT nei suddetti pazienti, le frequenze sono risultate: 5T/5T = 0,86%, 9T/9T = 0,86%.

Conclusioni. I dati che emergono dalla nostra esperienza dimostrano l'assenza di associazione tra azoospermia, le mutazioni del gene CFTR, il polimorfismo IVS8-polyT e le microdelezioni del cromosoma Y.

L'INFEZIONE DA PAPPILLOMAVIRUS NELL'AREA DEL GARDA BRESCIANO

F-08

O. Valentini, S. Cresceri, A. Torri¹, A. Todeschi, L. Pasetti, B. Milanese

Laboratori di Patologia Clinica e di ¹Anatomia Patologica, A. O. di Desenzano del Garda

Scopo del lavoro. Dal 2005 a oggi abbiamo analizzato per HPV-DNA 3118 campioni da tampone cervicale di pazienti dell'area gardesana. I dati raccolti intendono fornire un'informazione sulla prevalenza dei singoli genotipi infettanti di HPV nell'area considerata, utile in prospettiva per indirizzare verso strategie più efficaci di profilassi vaccinic.

Materiali e Metodi. Le indagini diagnostiche sono state condotte utilizzando il kit commerciale "AlphaStrip HPV" della Alphasgenics Diaco Biotechnologies in due successive versioni nell'arco del tempo. I genotipi 40, 42, 69, 43, 61, 70, 34, 44, 54 erano singolarmente identificabili solo nella prima versione del test, mentre i genotipi 26, 78, 73 e 82 solo nella seconda versione, che evidenzia il gruppo di genotipi 40/42/69 e il gruppo 43/61/70 ciascuno come banda cumulativa nell'ibridazione su striscia.

Risultati. Dei 3118 campioni finora analizzati 1103 (35.4%) sono risultati negativi e 2015 (64.6%) positivi per HPV: di questi ultimi 1210 (38.8%) per un singolo genotipo e 805 (25.8%) per due o più genotipi, per un totale di 2768 genotipi identificati. Tra i genotipi ad alto o medio rischio oncogeno si sono osservate le seguenti frequenze percentuali, espresse come rapporto tra numero di pazienti positive per uno specifico genotipo e numero totale di pazienti positive per HPV (moltiplicando per il coefficiente $2015/2768=0.728$ si ottengono le corrispondenti frequenze rispetto al totale dei genotipi identificati): genotipo 16 (27.5); 31 (14.4); 58 (11.8); 53 (10.9); 66 (9.0); 18 (8.8); 59 (6.3); 52 (5.4); 35 (5.2); 56 (5.2); 33 (4.8); 45 (3.9); 73 (3.6); 39 (3.4); 51 (3.4); 82 (2.2); 68 (1.1); 26 (0.3). Tra i genotipi a basso rischio l'ordine di frequenza è risultato il seguente: genotipo 54 (7.5); 42 (6.0); 6 (4.6); 61 (4.4); 70 (3.6); 40 (2.8); 34 (1.5); 11 (1.3); 44 (1.0); 43 (0.8); 69 (0.0); gruppo 40/42/69 (9.1); gruppo 43/61/70 (6.4).

Conclusioni. I due gruppi a basso rischio 40/42/69 e 43/61/70 hanno mostrato frequenza compatibile con la somma delle frequenze in precedenza rilevate per i singoli genotipi componenti. I genotipi 16, 31 e 58 sono quelli di riscontro più frequente in assoluto, mentre il genotipo 18 risulta solo sesto in ordine di prevalenza. Tra i genotipi a basso rischio il genotipo 6 mostra una prevalenza inferiore a quella dei genotipi 54 e 42, mentre il genotipo 11 risulta solo ottavo, con una prevalenza di poco superiore all'1%. I due vaccini in commercio, bivalente (Cervarix) contro i genotipi 16, 18 e tetravalente (Gardasil) contro i genotipi 6, 11, 16, 18 potranno perciò prevenire solo una parte delle infezioni, operando peraltro una pressione selettiva positiva sui genotipi non vaccinali. Va perciò considerata l'ipotesi dell'utilizzo in seconda battuta di vaccini a spettro allargato, che nell'area da noi analizzata dovrebbero comprendere quanto meno anche i genotipi 31 e 58.

GENOTIPI 53 E 66 DI HPV: ALTO O BASSO RISCHIO?**F-09****O. Valentini, S. Cresceri, C. Pasini, A. Torri¹, P. Fontana¹, A. Todeschi, L. Pasetti, B. Milanese**Laboratori di Patologia Clinica e di ¹Anatomia Patologica, A. O. di Desenzano del Garda

Scopo del lavoro. I genotipi 53 e 66 hanno una prevalenza tutt'altro che trascurabile e presentano tra loro una stretta relazione in termini tassonomici, essendo entrambi classificati, insieme con il genotipo 56, come specie 6, genere alfa di HPV. I dati di correlazione clinica reperibili in letteratura relativi a questi genotipi sono ancora piuttosto limitati. Le associazioni da noi rilevate tra le infezioni da essi sostenute e i corrispondenti quadri istologici e citologici possono perciò fornire un sia pur modesto contributo ai fini di meglio valutare il loro potenziale oncogenico.

Materiali e Metodi. Le indagini diagnostiche sono state condotte utilizzando il kit commerciale "AlphaStrip HPV" della Alphagenics Diaco Biotechnologies. Il saggio consente l'identificazione di 26 genotipi di HPV, a basso o ad alto/medio rischio oncogeno; altri genotipi eventualmente presenti vengono rilevati, ma non identificati, da una sonda universale.

Risultati. Dei 3118 campioni finora analizzati 1103 (35.4%) sono risultati negativi e 2015 (64.6%) positivi per HPV: di questi ultimi 1210 (38.8%) per un singolo genotipo e 805 (25.8%) per due o più genotipi, per un totale di 2768 genotipi identificati. Il genotipo 53 è stato riscontrato in 219 casi (10.9%): in 143 casi era associato con genotipi ad alto rischio (AR), in 5 casi associato con il genotipo 66 (1 ASCUS, 3LSIL-CIN1, 1 CIN3), in 17 casi con genotipi a basso rischio, BR, (7 ASCUS, 1 LSIL, 6 CIN1, 1 CIN2/3, 1 con Pap test negativo, 1 n.d., ossia senza dati del Pap test) e in 53 casi non associato (di cui 3 n.d., 7 con Pap test negativo, 18 ASCUS, 5 LSIL, 2 biopsie borderline, 15 CIN1, 1 CIN1/2, 1CIN2, 1 CIN3). Il genotipo 66 è stato riscontrato in 181 casi (9%): in 113 casi era associato con genotipi AR, in 5 casi associato a 53, in 5 casi con genotipi BR (2 ASCUS, 1 LSIL, 2 CIN1) e in 57 casi non associato (2 n.d., 6 con Pap test negativo, 21 ASCUS, 6 LSIL, 9 LSIL-CIN1, 13 CIN1).

Conclusioni. Nei casi con morfologia documentata in cui ciascun genotipo risultava come unico agente infettante (50 casi per il 53 e 55 casi per il 66) il rapporto numerico tra quadri citologici negativi o di incerto significato (ASCUS) e quadri con lesioni di basso grado era pari a 25/25 per il genotipo 53 (per il quale sono documentati anche 2 casi di displasia moderata) e pari a 27/28 per il genotipo 66. La confezione 53+66 nei 3 casi in cui è stata osservata era in tutti associata a lesioni, seppur di basso grado (diagnosi citologica di LSIL e istologica di CIN1). I dati osservati sembrano suggerire una moderata azione lesiva di questi genotipi, superiore a quella di genotipi classificati come BR. D'altra parte l'esiguo numero di casi con lesioni associate non di basso grado, in accordo con altri dati della letteratura che testimoniano bassi rapporti di prevalenza nei cervicocarcinomi (SCC) rispetto ai casi di LSIL per entrambi i genotipi (SCC/LSIL=0.01-0.02 per il 53 e SCC/LSIL=0.02-0.04 per il 66), ne escluderebbe l'alto rischio e dovrebbe orientare verso una loro collocazione in una categoria di rischio intermedio.

MUTAZIONI ASSOCIATE A EMOCROMATOSI EREDITARIA NEL BACINO DEL GARDA BRESCIANO**F-10****O. Valentini, S. Cresceri, A. Todeschi, L. Pasetti, B. Milanese**

Laboratori di Patologia Clinica, A. O. di Desenzano del Garda

Scopo del lavoro. Numerose sono le varianti geniche associate ad emocromatosi ereditaria analizzabili con i kit diagnostici in commercio. Abbiamo inteso verificare la prevalenza di 18 varianti relative ai geni HFE, TFR2 e FPN1 che il nostro sistema analitico è in grado di evidenziare. L'emocromatosi ereditaria è associata a due principali siti di mutazione del gene HFE, situato in prossimità del locus A del complesso HLA sul cromosoma 6: la transizione 845G>A sull'esone 4 di HFE con sostituzione cisteina>tirosina dell'aminoacido in posizione 282 (C282Y) e la trasversione 187C>G nell'esone 2 con sostituzione istidina>aspartato in posizione 63 (H63D). Una terza mutazione meno frequente è la trasversione 193 A>T nell'esone 2 (S65C) con sostituzione serina>cisteina in posizione 65. Oltre a queste tre principali varianti geniche la metodica da noi utilizzata per l'analisi genomica è in grado di rivelare altri 15 diversi siti di mutazione di più raro riscontro.

Materiali e Metodi. Abbiamo utilizzato il kit commerciale "Haemochromatosis StripAssay A" della Nuclear Laser Medicine, che consente l'identificazione postamplificativa mediante ibridazione su striscia con adese sonde allelespecifiche di 18 diversi alleli mutanti relativi ai geni HFE, TFR2 e FPN1. La negatività per ciascuna mutazione è confermata dall'ibridazione sulla stessa striscia della corrispondente sequenza genomica non mutante e ciò rende la metodica altamente affidabile.

Risultati. Le 555 analisi genotipiche per emocromatosi da noi finora effettuate hanno dato i seguenti risultati: 276 casi di omozigosi per gli alleli normali non mutanti; 163 casi di eterozigosi per H63D; 42 casi di eterozigosi per C282Y; 8 casi di eterozigosi per S65C; 24 casi di doppia eterozigosi per H63D e C282Y; 25 casi di omozigosi per H63D; 13 casi di omozigosi per C282Y; 1 caso di omozigosi per S65C. Le distribuzioni relative delle frequenze osservate in omozigoti ed eterozigoti appaiono essere compatibili con la legge di Hardy-Weinberg. In 3 casi si è osservata la mutazione S65C associata a una delle due mutazioni principali, per la precisione H63D: in tal caso il quadro ibridativo era compatibile, in ordine decrescente di probabilità, con una doppia eterozigosi in trans, una omozigosi per H63D associata a eterozigosi per S65C e infine una doppia omozigosi per entrambe le mutazioni. Nessuna delle altre 15 mutazioni analizzabili è stata evidenziata sul totale dei 555 campioni esaminati.

Conclusioni. Nella popolazione da noi esaminata le mutazioni riscontrate sono le ben note H63D, C282Y, S65C, elencate in ordine decrescente di frequenza. Tutte le altre mutazioni, di cui in teoria non si può escludere la presenza, forse dimostrabile su un campione ancora più ampio, sono tuttavia con ogni evidenza estremamente rare. Per questo motivo, almeno per quanto riguarda la zona geografica su cui la nostra indagine è stata condotta, parrebbe pienamente giustificato l'utilizzo di metodiche che limitano l'analisi genotipica alle tre classiche varianti.

ALCUNI DATI COMPARATIVI PER DUE DIVERSE METODICHE DI ANALISI GENOTIPICA PER HPV**F-11****O. Valentini, S. Cresceri, A. Todeschi, L. Pasetti, B. Milanese**

Laboratori di Patologia Clinica, A. O. di Desenzano del Garda

Scopo del lavoro. Mentre per vari anni abbiamo effettuato l'analisi genotipica di HPV utilizzando il kit commerciale "AlphaStrip HPV" della Alphagenics Diaco Biotechnologies, da alcune settimane stiamo impiegando il sistema INNO-LiPA HPV Genotyping Extra della Innogenetics. Alcuni campioni sono stati analizzati con entrambe le metodiche per valutare il grado di concordanza nei risultati.

Materiali e Metodi. Il sistema analitico Alphagenics (AlphaStrip II HPV) prevede due amplificazioni genomiche in serie. L'amplificato biotinilato viene fatto ibridare su striscia di nitrocellulosa che porta adese le sonde genotipospecifiche, oltre a bande di controllo e sonde universali per HPV. La specificità è del 99,9% e la sensibilità è pari a 50 copie/campione. Il saggio consente l'identificazione di 20 singoli genotipi e dei due gruppi genotipici 40/42/69 e 43/61/70. Il sistema INNO-LiPA può identificare 28 differenti genotipi e si avvale di un programma interpretativo (LiRAS, Line Reader and Analysis Software) per l'analisi delle bande di ibridazione su striscia, che si rende necessario per la mancanza di una perfetta corrispondenza tra banda reattiva e genotipo: alcuni genotipi sono caratterizzati da più bande reattive e alcune bande reattive sono comuni a più genotipi. La sensibilità varia da 20 a 70 copie/reazione.

Risultati. L'analisi comparativa è stata effettuata su 32 campioni, ottenendo identici risultati per 22 di essi (8 positivi e 14 negativi). Per 7 campioni si sono ottenuti risultati parzialmente concordanti (fuori parentesi i risultati Alphagenics, in parentesi quelli Innogenetics: 33 (33+51); 31+39 (31+39+51); 53+gruppo 40/42/69 (53); 6+52+56+66 (52+66); 58 (58+66); 16+31+53 (31+53); 16+53 (53). Per 3 campioni si sono ottenuti risultati del tutto discordanti: 6 (negativo); gruppo 40/42/69 (negativo); 31+59 (52).

Conclusioni. I pochi dati raccolti possono essere solo indicativi. La concordanza tra i due metodi è discreta, ma non assoluta. L'INNO-LiPA ha fornito un maggior numero di risultati negativi (2 dei risultati discordanti) e ciò potrebbe essere dovuto a una maggiore sensibilità del metodo "nested" di Alphagenics, mentre il terzo dei risultati discordanti (genotipi 31+59 per Alphagenics, contro genotipo 52 per Innogenetics) potrebbe forse essere attribuibile ad una diversa efficienza amplificativa e/o ibridativa sui differenti genotipi intrinseca alle due metodiche, a sua volta imputabile ai differenti tipi di innesco per la reazione polimerasica e alla notevole differenza nella lunghezza degli amplificati (gli SPF10 della PCR LiPA sono decisamente più corti). Nel complesso entrambe le metodiche ci appaiono di ottima qualità e affidabilità.

I POCT NEL PERCORSO DIAGNOSTICO TERAPEUTICO DEL PAZIENTE DIABETICO**F-12****M.R. Cavallo¹, A. Villani¹, V. Granero¹, G. Boglione, E. Richetta, A. Ozzello²**¹Laboratorio Analisi ASL TO3 Pinerolo; ²Diabetologia ASL TO3 Pinerolo

Scopo del lavoro: Rivalutare il ruolo dei professionisti della Medicina di Laboratorio nel percorso diagnostico terapeutico assistenziale del Diabete mellito nella fase di definizione e monitoraggio della terapia.

Metodi e materiali: L'attenzione è stata focalizzata principalmente su 2 problemi: la correttezza dell'uso (prelievo, CQI e manutenzione) degli strumenti, la formazione degli utilizzatori siano essi infermieri o pazienti. Il Laboratorio, applicando i requisiti descritti nelle norme ISO 15189 e 22870 ed in ottica di prevenzione del rischio clinico, ha preso in carico la completa gestione dei glucometri presenti nei reparti degli Ospedali Riuniti di Pinerolo attivando simultaneamente un'azione di verifica e controllo sui glucometri destinati ai pazienti del territorio distribuiti dalla diabetologia. Si è provveduto alla verifica dello stato dell'arte con un audit iniziale sulle modalità di utilizzo dei glucometri e sulla qualità del dato con prove comparative in laboratorio; analisi delle criticità e pianificazione delle azioni di miglioramento in condivisione con la diabetologia e l'associazione dei pazienti diabetici (FAND); realizzazione di incontri formativi educazionali con i reparti e con il direttivo della FAND; pianificazione e realizzazione in tutoraggio delle prime azioni di controllo qualità e manutenzione; stesura della istruzione operativa e alla definizione delle modalità di registrazione di controlli e manutenzioni; pianificazione della formazione in collaborazione con la scuola di formazione nazionale Associazione Medici Diabetologi (AMD); pianificazione audit di valutazione di efficacia delle azioni di miglioramento.

Risultati: Miglioramento delle conoscenze delle differenze tra glicemia capillare e venosa, delle possibili interferenze sulle determinazioni capillari, della necessità di valutare periodicamente i dati con il laboratorio, dell'importanza del CQI, della necessità della manutenzione e della indispensabilità della supervisione del laboratorio. Ovviamente in questa prima fase i costi sono leggermente aumentati.

Discussione e conclusioni: Ottimi i risultati sulla qualità attuale dei dati in reparto e della compliance dei pazienti esterni, vinte le prime difficoltà iniziali il personale infermieristico collabora alla corretta gestione dei glucometri e guarda al laboratorio con meno diffidenza e con più collaborazione. Pienamente realizzato l'obiettivo del miglioramento delle performance nel percorso diabete. Aspirazione più ampia è l'estensione nel prossimo anno delle conoscenze ed del controllo alla popolazione attraverso incontri informativi.

EMOGLOBINA GLICATA E CONTROLLO GLICEMICO**F-13****M. Laneve, M.G. Tinelli, A. Bafunno, B. Grossi**

Laboratorio di Patologia Clinica P.O. Occidentale (Mottola-TA) ASL TA

Scopo del lavoro: Nei pazienti (pz) diabetici il glucosio, presente nel sangue ad alte concentrazioni, si lega alle catene beta dell'emoglobina A1 ($\alpha 2\beta 2$) formando l'emoglobina glicata (HbA1c) la quale non trasporta l'ossigeno con la stessa efficacia dell'emoglobina A1 causando danni ai vari organi e tessuti. L'HbA1c aumenta proporzionalmente alla glicemia, rispecchiando perciò i valori glicemici. Il processo di glicosilazione dell'emoglobina richiede alcune settimane, pertanto la concentrazione di HbA1c fornisce una stima retrospettiva della glicemia di circa centoventi giorni. Obiettivo del nostro lavoro è stato: analizzare i valori dell'HbA1c nella nostra popolazione, valutare la distribuzione dei pazienti per sesso ed età, definire i livelli di glicemia corrispondenti alle diverse percentuali dell'HbA1c.

Materiali e Metodi: Tra Maggio 2008 e Maggio 2009 abbiamo esaminato 966 pz ricoverati e ambulatoriali esterni. I dosaggi della glicemia e dell'HbA1c sono stati ottenuti con gli analizzatori DIMENSION RXL (DADE), metodo esochinasi e ADAMS A1c HA8160 (MENARINI), metodo HPLC.

Risultati: Abbiamo suddiviso i pz in base alla percentuale di HbA1c, differenziandoli per sesso ed età. Non è possibile stabilire una concentrazione soglia di HbA1c al di sotto della quale sicuramente non si avranno complicanze ma, in linea generale, livelli inferiori al 6% sono considerati normali. I dati ottenuti sono i seguenti:

%HbA1c	Fino a 5,99 %	6-6,99%	7-7,99%	8-8,99%	>9 %
n° di pz	207	258	212	117	172
Maschi	106	131	111	51	101
Femmine	101	127	101	66	71
Età media	46	38	37	42	41
Glicemia media (mg/dl)	102	124	155	179	239

Discussione e conclusioni: Si deduce che, nella popolazione studiata, il rapporto fra HbA1c e glicemia è: fino a 5,99% di HbA1c abbiamo in media 102 mg/dl di glicemia; tra 6-6,99% in media 124 mg/dl; tra 7-7,99% in media 155 mg/dl; tra 8-8,99% in media 179 mg/dl; al di sopra del 9% in media 239 mg/dl. I pz avevano un'età compresa tra 37 e 46 anni, con una leggera prevalenza dei maschi. Per valutare al meglio lo stato glicemico del pz diabetico è dunque indispensabile associare al dosaggio della glicemia la determinazione dell'HbA1c che fornisce informazioni sulla media glicemica degli ultimi 120 giorni.

“LA TIROIDE SCENDE IN PIAZZA”: EFFICACIA DELLA SENSIBILIZZAZIONE SULLA POPOLAZIONE RIGUARDO LA FUNZIONALITÀ TIROIDEA. ANALISI PRELIMINARE**F-14****A. Ferrari, R. Castello¹, L. Furlani², B. Caruso, N. Melloni, D. Nicolis, M. Rocca, C. Cocco, M.S. Graziani, P. Rizzotti**Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, OCM, Verona; ¹Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, OCM, Verona; ²Servizio di Endocrinologia, Ospedale Sacro Cuore, Negrar

Scopo del lavoro. L'Associazione Medici Endocrinologi, l'Azienda Ospedaliera di Verona, l'Ospedale di Negrar e le Aziende Sanitarie 20 e 22 hanno proposto l'iniziativa “La tiroide scende in piazza” per sensibilizzare la popolazione sulla funzionalità tiroidea. Il laboratorio è stato coinvolto per il dosaggio di TSH reflex e AbTPO.

Materiali e Metodi. Le manifestazioni si sono svolte nella provincia di Verona (Illasi e Negrar) e prevedevano 4 fasi: accettazione anagrafica; visita endocrinologica; prelievo ematico; ecografia del collo. I test di laboratorio sono stati eseguiti con Advia Centaur XP (Siemens). Sono stati esaminati i cittadini che non riferivano precedenti patologie tiroidee (Illasi n=443 e Negrar n=559).

Risultati. I risultati sono riportati nelle tab.1-2.

	TSH <0,35		TSH 0,35-3,7		TSH 3,7-4,3		TSH >4,3	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ILLASI n=443	9	2,0%	422	95,3%	3	0,7%	9	2,0%
NEGRAR n=559	14	2,5%	518	92,7%	7	1,3%	20	3,6%
Totale n=1002	23	2,3%	940	93,8%	10	1,0%	29	2,9%

	TSH 0,35 -37					
	TPO <60		TPO 60-200		TPO >200	
	n	%	n	%	n	%
ILLASI n=422	341	80,8%	22	5,2%	59	14,0%
NEGRAR n=518	454	87,6%	23	4,4%	41	7,9%
Totale n=940	795	84,6%	45	4,8%	100	10,6%

Conclusioni. Il TSH reflex potrebbe essere sufficiente per valutare la funzionalità tiroidea come test di screening. AbTPO presenti in soggetti eutiroidei potrebbero indicare una patologia autoimmune non “ancora” clinicamente espressa.

ANALISI CITOFLUORIMETRICA DEL POOL DI CELLULE PROGENITRICI ENDOTELIALI IN PAZIENTI CON DIABETE MELLITO

F-15

M. Greco, F. Accattato, R. Barbuto, A. Brunetti¹, D. Foti, E. Gulletta

Patologia clinica, ¹Endocrinologia, DMSC, Facoltà di Medicina, Università Magna Graecia, Catanzaro

Le cellule progenitrici endoteliali (EPC), prodotte dal midollo osseo a partire da cellule ematopoietiche staminali, sono presenti in circolo e hanno un ruolo chiave nella neoangiogenesi dell'adulto e nel mantenimento dell'integrità vascolare. Nei soggetti diabetici, la gravità clinica della malattia vascolare occlusiva è stata, in parte, attribuita ad un alterato sviluppo dei vasi collaterali causato da una riduzione del numero di EPC circolanti. Le EPC sono caratterizzate dall'espressione di antigeni di superficie delle cellule ematopoietiche staminali (CD133) e, nelle fasi successive di maturazione, dall'espressione di antigeni delle cellule endoteliali, quali CD34 e VEGFR2 (KDR). Il numero e/o la funzione delle EPC possono essere alterati in condizioni cliniche caratterizzate da elevato rischio cardiovascolare, come nel caso del Diabete mellito.

Scopo del lavoro: Il presente studio prevede la caratterizzazione fenotipica e la valutazione quantitativa delle EPC circolanti mediante citofluorimetria in pazienti con Diabete mellito.

Materiali e metodi: Lo studio è stato condotto, finora, su 13 pazienti diabetici con HbA1c di 7-8 % e su 10 volontari sani. Le EPC vengono definite dall'espressione di tre antigeni di superficie: CD34, CD133 e VEGFR2(KDR). Utilizzando tali marcatori, abbiamo caratterizzato e quantificato le EPC nel circolo periferico. 50-100 µl da prelievi di sangue in EDTA venivano incubati con anticorpi monoclonali: CD34-PerCP (BD), VEGFR2 (KDR)-PE (R&D), CD133/2 (293C3)-biotinilato ed anticorpi antibiotina FITC (Miltenyi Biotec) ed i rispettivi isotipi di controllo. Dopo lisi eritrocitaria e opportuni lavaggi, i campioni vengono analizzati mediante citofluorimetria. L'analisi è stata effettuata sulla popolazione dei linfomonociti, attraverso la creazione di un gating immunologico sui linfociti totali, con acquisizione di almeno 20.000 eventi (su un totale di 80-100.000). Le EPC sono state caratterizzate come sottopopolazione CD34(+)/VEGFR2-KDR(+), in accordo con i dati di letteratura.

Risultati: L'analisi ha rivelato una riduzione di circa il 60% delle EPC circolanti nei pazienti diabetici rispetto ai controlli sani (0,62±0,36% dei linfomonociti nei controlli sani; 0,24±0,14% dei linfomonociti nei diabetici).

Discussione e Conclusioni: Variazioni del pool di EPC circolanti possono avere ricadute sul piano clinico in pazienti con fattori di rischio cardiovascolare, come il Diabete mellito. Pertanto poter misurare, in maniera riproducibile e ben standardizzata, la popolazione delle EPC quali marcatori dell'efficacia dei processi riparativi vascoloendoteliali, rappresenta un nuovo ed importante obiettivo della medicina di laboratorio.

CONFRONTO TRA L'EQUAZIONE MDRD E LA FORMULA CKD-EPI PER LA VALUTAZIONE DI eGFR

F-16

G. Lobreglio, T. Suppa, D. Turco

U.O. Medicina di Laboratorio, A.O. "Card G Panico", Tricase

Introduzione. La creatinina è il principale parametro biochimico attualmente utilizzato per il monitoraggio della funzionalità renale; a causa della non linearità della relazione tra valori sierici di creatinina e della funzione del rene, nel tempo sono state proposte diverse equazioni basate anche su altri parametri per la stima del GFR; tali equazioni, tuttavia, presentano variabili prestazioni rispetto al GFR misurato con la clearance di marcatori di filtrazione esogeni. Questo studio ha lo scopo di confrontare una nuova formula con l'equazione in uso (MDRD) per il calcolo del GFR.

Materiali e metodi. Il calcolo del GFR è stato eseguito su 28236 campioni consecutivi pervenuti in Laboratorio per la misurazione della creatinina, da degenti delle U.O. dell'A.O. (67%) e da soggetti ambulatoriali (33%) di età compresa tra 18 e 75 anni (14149 maschi e 14087 femmine). La creatinina sierica è stata misurata mediante il metodo cinetico Jaffé e ricalibrazione con metodi IDMS tracciabili, su analizzatori Synchron LXi 725 e Unicel Dx C 600i (Beckman Coulter). Il GFR è stato stimato sia mediante l'equazione MDRD: $175 \times [\text{Creatinina}]^{\text{elevato}-1,154 \times (\text{Età in anni}) \text{el.}-0,203 \times 0,742 \text{ se femmina e } \times 1,210 \text{ se afro-americano, che con la nuova equazione CKD-EPI proposta da Levey et al: } \text{GFR} = a \times (\text{Creatinina sierica}/b)^{\text{el. } c \times (0,993)^{\text{el. età, dove la variabile "a" è dipendente dall'etnia e dal sesso, "b" è dipendente dal sesso e "c" è dipendente dal sesso e dal valore di creatinina sierica. Il confronto tra il GFR stimato con le due equazioni è stato eseguito sia su tutti i campioni che, separatamente, sui campioni con GFR < a 60 ml/min/1,73 m² e con GFR compreso tra 60 e 130.$

Risultati. La mediana del GFR calcolato con l'equazione MDRD è risultata di 80,8 ml/min su tutti i campioni, di 38,4 su 8285 campioni con GFR < 60 e di 90,6 su 19951 campioni con GFR tra 60 e 130 ml/min; le mediane ottenute con la nuova formula sono state rispettivamente di 81,21; di 35,6 e di 91,15.

Discussione e conclusioni. Dai risultati ottenuti risulta che l'equazione MDRD, ampiamente accettata dalla comunità scientifica e diffusa nei laboratori di patologia clinica per la stima di GFR, e la nuova equazione CKD-EPI, sviluppata e validata di recente e proposta per la valutazione più accurata della funzione renale, presentano comportamenti differenti nell'ampio spettro di valori di GFR; per GFR < 60 le mediane ottenute con l'equazione MDRD risultano più elevate, mentre per valori di GFR tra 60 e 130 la mediana di GFR calcolata con la formula CKD-EPI risulta modestamente più elevata, a conferma della sottostima del GFR calcolato con MDRD per questi valori di clearance renale.

Bibliografia

Levey et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. Ann Intern Med 2009; 150: 604-612

CORRELAZIONE TRA FUNZIONALITA' TIROIDEA E RENALE IN DONNE ALLA OTTAVA SETTIMANA DI GRAVIDANZA

F-17

G. Ozzola, G. Polverini, C. Sommella

Sez.Laboratorio Analisi, Dipartimento Patologia Clinica, Ospedale del Casentino (AR)

Scopo del lavoro: gli ormoni tiroidei hanno, tra le tante funzioni, anche la capacità di regolare la pressione arteriosa e le resistenze vascolari e quindi la funzionalità renale. In gravidanza è importante valutare la velocità di filtrazione glomerulare (GFR) che oggi può essere fatta anche con formule che partendo dalla creatininemia tengono conto anche del sesso, dell'età e dell'etnia del soggetto e ciò può essere fatto applicando la formula MDRD. In gravidanza le complicazioni dovute a disfunzione tiroidea con interessamento renale sono molte e possono essere gravi. Scopo del lavoro è indagare l'influenza della funzionalità tiroidea su quella renale in donne alla ottava settimana di gravidanza.

Materiali e Metodi: è stato effettuato uno studio su 700 donne gravide da circa 8 settimane. La creatinina sierica è stata dosata su strumento Olympus AU640 tramite metodo Jaffè. Il TSH sierico è stato dosato su strumento Centaur (Siemens) tramite immunochemiluminescenza diretta.

Risultati: le donne hanno età media di 30.8 anni \pm 5.2 e si sono sottoposte al prelievo dopo 8.6 \pm 3.3 settimane di gravidanza. La mediana di TSH riscontrata è di 1.58mUI/L con range di 9.94mUI/L ed il valore medio di MDRD è risultato di 95.2 \pm 13.8 mL/min. La correlazione tra TSH e MDRD è di -0.0978 con significatività pari a $p < 0.01$.

Discussione e Conclusioni: numerosi studi indicano che la funzionalità renale è influenzata da quella tiroidea ed al contempo è noto che in gravidanza vi possono essere complicanze, anche molto gravi, legate alla funzionalità renale. Ad oggi l'uso della formula MDRD non è stato ancora validato in gravidanza. In questo studio si è valutato se vi è correlazione tra due parametri, TSH e MDRD, indicatori rispettivamente della funzionalità tiroidea e di quella renale ed è risultato che le due variabili sono tra loro inversamente correlate e che tale correlazione è statisticamente significativa. Tale dato porta a concludere che nelle prime settimane di gravidanza l'attività tiroidea, studiata col dosaggio del TSH, influenza quella renale valutata tramite la formula MDRD. Per avere uno studio definitivo ed una sua eventuale e concreta utilità clinica rimane a confrontare e correlare i dati ottenuti su TSH e MDRD all'inizio della gravidanza con il decorso della stessa.

ELEVATI LIVELLI DI TSH IN GRAVIDANZA: DIAGNOSI PRECOCE, ADEGUATA ED IMMEDIATA TERAPIA ED OUTCOME DELLA GRAVIDANZA

F-18

G. Ozzola, C. Sommella, G. Polverini

Laboratorio Analisi Casentino, USL8, Arezzo

Scopo del lavoro: l'ipotiroidismo in gravidanza può comportare varie e gravi complicanze e quindi necessita di una diagnosi precoce e di una ottimale gestione terapeutica sostitutiva. Questo lavoro vuole dimostrare che una diagnosi precoce di marcato ipotiroidismo gravidico da tiroidite cronica ed una tempestiva terapia sostitutiva possano garantire un buon outcome della gravidanza stessa.

Materiali e metodi: è stato dosato il TSH in 700 donne al primo trimestre di gravidanza (settimana media 8.46 \pm 3.81) di età media pari a 34 \pm 5 anni. Il dosaggio del TSH è stato fatto su siero con metodo immunometrico in chemiluminescenza diretta a due siti tramite strumento Advia Centaur (Siemens Healthcare, Tarrytown, USA). Come outcome della gravidanza sono stati considerati avversi i seguenti eventi: aborto spontaneo, diabete gestazionale, parto prematuro, oligoidramnios, preeclampsia.

Risultati: nel corso di questo studio 6 donne avevano valori di TSH > 12 mUI/L e quindi molto elevati (min. 12.61 mUI/l e max 124.66 mUI/l) rispetto al valore medio riscontrato nella popolazione oggetto dello studio (2.38 \pm 7.21mUI/L con mediana pari a 1.58 mUI/L e range di 9.94 mUI/L). Tali donne sono state immediatamente trattate con terapia sostitutiva sino a ottenere valori di TSH nel range normale per una popolazione adulta. Le 6 donne hanno avuto un decorso fisiologico della gravidanza. I successivi accertamenti effettuati nel corso della gestazione hanno dimostrato che tutte le 6 donne erano affette da tiroidite cronica e che in due di queste nella precedente gravidanza era insorto diabete gestazionale. Nessuna delle sei donne era primipara.

Conclusioni: la determinazione del TSH nel primo trimestre di gravidanza è un importante strumento di diagnosi per l'ipotiroidismo. Infatti lo screening da noi fatto ha permesso di instaurare una adeguata e precoce terapia nelle 6 donne con valori molto elevati e quindi di prevenire complicanze anche gravi che potrebbero essere eventualmente sopraggiunte. Va comunque ricordato che due delle sei donne avevano sviluppato, in una gravidanza precedente, un diabete gestazionale che poteva essere un segno clinico premonitore dello sviluppo di una successiva tiroidite cronica.

DETERMINAZIONE DEL VALORE DI RIFERIMENTO DELLA CREATININA CON METODI INDIRECTI

F-19

S. Platzgummer, D. Giavarina¹, G. Götsch, A. Joos, S. Nosari

Laboratorio Analisi Ospedale di Merano (BZ) e ¹Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

Scopo del lavoro: Lo scopo è determinare i valori di riferimento per la creatinina della nostra popolazione, utilizzando i dati estratti dal database di laboratorio e confrontarli con i valori di riferimento (VdR) attualmente in uso; inoltre lo scopo è valutare l'applicabilità del metodo indiretto per la determinazione dei valori di riferimento della creatinina.

Materiali e Metodi: Utilizzo delle proposte della linea guida C28-P3 vol 28.11 CLSI per il calcolo dei valori di riferimento. Estrazione dei valori della creatinina nel periodo 2005- 2008 dal database di laboratorio (f: 50084, m: 45461). Criteri di esclusione: persone ospedalizzate o precedentemente ospedalizzate, valori multipli per paziente, tutte le persone esente dal ticket per patologia, prelievi non a digiuno.

Ripartizione dei dati, determinazione dei valori aberranti e valutazione statistica: I dati sono stati ripartiti secondo sesso ed età e sottoposti ad una valutazione statistica: Kolmogorov Smirnov e test di Levene, calcolo dei percentili, test di Tukey e Dixon per la eliminazione dei valori aberranti e calcolo del limite superiore del valore di riferimento (H-VdR).

Risultati: I valori di creatinina, dopo aver eliminato gli outliers, si sono distribuiti in maniera normale in ogni fascia di valutazione. Per i pazienti di età inferiore ai 16 anni, i VdR per maschi e femmine sono uguali e corrispondono ai VdR in uso. Per i maschi di età compresa tra 16 - 65 anni e per le femmine tra 16 - 75 anni, la differenza dei VdR è di 0,2 mg/dl e i VdR calcolati con i metodi indiretti corrispondono ai valori in uso (m: 1,2 mg/dl, f: 1,0 mg/dl). Per i maschi di età sopra i 65 anni e le femmine al di sopra di 75 anni i VdR ottenuti con entrambi i metodi sono distintamente più alti rispetto ai VdR attualmente in uso.

Conclusioni: Il metodo di Dixon è meno sensibile a riconoscere i valori aberranti rispetto al metodo Tukey. Nei pazienti oltre i 65 anni (maschi) e 75 anni (femmine) è raccomandato utilizzare un metodo diretto con questionario dettagliato, per poter valutare la discrepanza ottenuta tra i dati estratti dal computer ed i valori di riferimento attualmente validi. I dati ottenuti indicano che i valori di riferimento per gli anziani devono essere rivisti e confermano la scetticità dell'utilizzo della formula MDRD per il calcolo della filtrazione glomerulare nei soggetti oltre i 70 anni. La stima del VdR della creatinina con metodi indiretti è un'alternativa valida per la determinazione del VdR fino all'età di 65 anni (maschi) e 75 anni (femmine). Per pazienti di età superiore, sono necessarie ricerche più approfondite con metodi diretti.

HOMOCYSTEINE LEVELS AND ERYTHROCYTE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY IN AN HEMODIALYSIS POPULATION

F-20

M. Dessi¹, A. Noce², G. Ricci³, S. Manca-di-Villahermosa², G. Fucci¹, S. Casciani¹, G. Federici¹, M. Taccone-Gallucci², R. Massoud¹

¹Department of Laboratory Medicine, ²Nephrology and Dialysis Unit, Tor Vergata University Hospital, Rome. ³Department of Chemical Sciences and Technologies Tor Vergata University, Rome

Aim of the study. To evaluate the relationship between total plasma homocysteine (Hcy) and erythrocyte glutathione s-transferase (e-GST) activity in 62 ESRD patients on maintenance hemodialysis (MHD) and in 57 healthy controls.

Methods. Plasma total Hcy was assayed by an HPLC method using reversed-phase separation and fluorescence detection. Erythrocyte e-GST activity was detected by a photometric method applied on an automatic system of clinical chemistry at 340 nm with the standard substrate (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) and co-substrate (reduced glutathione).

Results. Over-activity of glutathione S-transferase (GST) was detected in the erythrocytes of uremic patients. Either mean e-GST activity and mean plasma Hcy levels were increased in HD patients compared to controls ($10,47 \pm 2,86$ U/gr Hb versus 5.63 ± 1.7 U/gr Hb, $p < 0.0001$; 52.42 ± 28.63 μ mol/L versus 13.65 ± 6.13 μ mol/L, $p < 0.0001$). Further, a significant direct correlation was found between plasma Hcy levels and e-GST activity ($r = 0.79$, $p < 0.0001$).

Conclusions. GST may be considered a marker of uremic toxicity. Hyperhomocysteinemia is present in more than 90% ESRD patients on MHD and elevated plasma Hcy may increase the risk of cardiovascular disease. The molecular mechanisms responsible for the reduced bioavailability of endothelium-derived nitric oxide (NO) induced by Hcy may involve an increase of oxidative stress at the vascular level and an important inhibition of the enzymatic antioxidant capacity. Since it was observed that the glutathione peroxidase (GPx) activity is inhibited by high plasma concentration of Hcy, the increased e-GST activity may be due to an enhanced oxidative stress always observed in HD patients and in particular under severe hyper-homocysteinemia conditions.

MIELOPEROSSIDASI E BNP NELL'INSUFFICIENZA CARDIACA**F-21****N. Federici¹, G. De Carli¹, S. Gaggiotti¹, R. Germani¹, N. Aspromonte², T. Di Giacomo², C. Galli³, C. Gambetta¹**¹UOC Laboratorio Analisi Ospedale Santo Spirito Roma, ²Cardiologia Ospedale Santo Spirito Roma, ³Abbott Diagnostici

Scopo del lavoro: la determinazione dei livelli di mieloperossidasi (MPO) viene considerata utile nella stratificazione del rischio e nella prognosi della patologia miocardica ischemica. Alcune recenti evidenze ne hanno suggerito un ruolo anche nello scompenso; lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la eventuale correlazione tra MPO e peptide natriuretico di tipo B (BNP) e le dinamiche dei due parametri in campioni di pazienti con insufficienza cardiaca.

Metodi: nel corso di sei mesi abbiamo raccolto 130 campioni (plasma EDTA in provette di plastica) di 69 pazienti (41 maschi, 28 femmine; età media 75,7+6,7 anni, mediana 77) con insufficienza cardiaca di vario grado afferenti al nostro Ospedale. I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti ad una velocità di 3.000 rpm, il plasma così separato veniva stoccato a una temperatura di -20°C. per essere analizzato entro una settimana sia per BNP che MPO con le metodiche CMIA su sistema automatizzato Abbott ARCHITECT. I valori sono stati confrontati con i livelli di BNP [normali (A)=<100 pg/mL; modicamente elevati (B)= 100-500 pg/mL; fortemente elevati (C)= >500 pg/mL] e correlati mediante il coefficiente di Pearson, valutando inoltre l'andamento nel tempo per i pazienti con prelievi multipli. In assenza di riferimenti nella nostra popolazione, come soglia per valori elevati di MPO abbiamo considerato il valore di 278 pmol/L, corrispondente al 95° percentile dei soggetti sani indicati nella metodica.

Risultati: i livelli di MPO non mostravano variazioni significative con l'incremento del BNP: A= 27 campioni, media 150,9+53,6; B= 57 campioni, media 200,6+189,9; C = 47 campioni, media 176,1+208,7. L'ambito di concentrazione era però molto maggiore tra i pazienti con BNP elevato, e livelli di MPO >278 pmol/L non erano rilevabili nei campioni con BNP normale ma erano presenti nel 7,7% dei casi con BNP >100 pg/mL (p<0,05). I profili di monitoraggio analizzati, relativi a 17 pazienti con 3-9 prelievi nell'arco di alcune settimane o mesi, mostrano andamenti non univoci, confermando la scarsa associazione dei due parametri (r= 0,059).

Conclusioni: i livelli di mieloperossidasi non appaiono correlati con l'entità dello scompenso cardiaco, confermando alcuni studi preliminari. Il ruolo dei processi infiammatori nell'insufficienza cardiaca potrà essere maggiormente chiarito con un follow-up prolungato che tenga conto anche delle terapie effettuate e di eventuali altre patologie cardiovascolari concomitanti.

COMPONENTE MONOCLONALE IgG/LAMBDA IN POSIZIONE ALFA DUE. ESPOSIZIONE DI UN CASO CLINICO**F-22****N. Camusso, G. Nespolo**

Servizio Medicina di Laboratorio P.O."San Martino" A.S.L n°5 Oristano

Scopo: Le componenti monoclonali sono bande proteiche rilevate all'elettroforesi, caratterizzate da una uniforme carica elettrica, uguale peso molecolare e monospecifiche, che migrano in posizioni specifiche. Il presente lavoro illustra come in alcuni casi, anche se rari, sia possibile evidenziare bande in posizioni differenti rispetto a quelle che ci si aspetta per il tipo d'immunoglobulina. Il campione di una pz di 72 aa all'elettroforesi rileva una banda monoclonale in posizione alfa due che viene identificata come IgG/Lambda.

Materiali. Elettroforesi su gel d'agarosio (SAS Helena Laboratories), nefelometria (BNA II Dade), immunofissazione (SAS Helena Laboratories).

Risultati. L'elettroforesi evidenzia una banda monoclonale in posizione alfa due. Al dosaggio nefelometrico si osserva un aumento delle IgG (2520 mg/dl) e delle catene leggere Lambda (589 mg/dl). L'immunofissazione conferma la presenza di una banda IgG/Lambda in posizione alfa due.

Conclusioni. Se pur raramente le immunoglobuline migrano in posizioni non "classiche" e il dosaggio nefelometrico eseguito contemporaneamente all'elettroforesi rappresenta un aiuto interpretativo in attesa dell'immunofissazione che rimane la tecnica elettiva per la diagnostica delle componenti monoclonali.

PROFILO DELLA FERTILITA' FEMMINILE: CONFRONTO TRA METODOLOGIE DI DOSAGGIO**F-23****I. Sacco, M. Falbo, F. Costantino, M.C. Berlinghieri, D. Foti**

Patologia clinica, Facoltà di Medicina, Università Magna Magna Græcia, Catanzaro

Il dosaggio degli ormoni della fertilità nello studio delle condizioni di infertilità/ipofertilità femminile è di significativo interesse scientifico e di notevole impatto socio-sanitario. La valutazione di FSH, LH, Estradiolo, Progesterone, Prolattina e Testosterone ha principalmente lo scopo di studiare la funzionalità complessiva dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Ovaio per il ruolo che esso svolge sulla capacità riproduttiva.

Scopo dello studio: Scopo dello studio è fornire un confronto tra due metodiche analitiche per la determinazione degli ormoni della fertilità: una in elettrochemiluminescenza, più consolidata e diffusa, l'altra basata su un sistema multiparametrico, BAT (Biochip Array Technology), di recente introduzione.

Materiali e metodi: Sono state condotte prove di accuratezza, utilizzando concentrazioni scalari di campioni di controllo e prove di precisione (interserie e intraserie) mediante un pool di sieri a titolo noto. Inoltre, sono stati utilizzati 50 sieri selezionati di pazienti donne in età fertile. Il dosaggio degli ormoni è stato eseguito simultaneamente con i metodi BAT su Randox Evidence Investigator ed Elettrochemiluminescenza (ECL) su Roche Elecsys 2010. BAT utilizza sia reazioni immunocompetitive che a sandwich. Ogni pannello è composto da 9 biochips la cui superficie è suddivisa in più regioni discrete di test (DTRs) contenenti i substrati solidi per ogni reazione. Il segnale chemiluminescente generato dalla reazione perossidasi viene rilevato da una fotocamera CCD e interpretato dal software. I test immunologici effettuati su Elecsys Roche 2010 si basano sull'utilizzo del complesso Rutenio-Tripropilammina.

Risultati: Le prove di accuratezza e precisione per entrambe le metodiche sono risultate soddisfacenti. Per ogni ormone valutato nei sieri studiati, i coefficienti di correlazione sono stati ottenuti incrociando i risultati di entrambe le metodiche. In particolare è stata rilevata un'ottima correlazione nella determinazione di LH ($R^2 = 0,931$), mentre il dosaggio di FSH ha dimostrato avere un basso coefficiente di correlazione ($R^2 = 0,384$). Nei dosaggi degli altri ormoni considerati, la correlazione è risultata: Estradiolo $R^2 = 0,908$; Prolattina $R^2 = 0,684$; Testosterone $R^2 = 0,874$; Progesterone $R^2 = 0,797$.

Discussione e conclusioni: Il raffronto tra un dosaggio consolidato nella pratica di laboratorio per l'affidabilità del metodo (ECL) e quello innovativo multiparametrico (BAT) suggerisce che quest'ultimo può rappresentare una valida alternativa nella valutazione dell'assetto ormonale dell'infertilità femminile, in quanto fornisce, per il singolo paziente, un profilo ormonale completo in un'unica seduta analitica. E' in fase di elaborazione un ulteriore confronto con la metodica RIA tradizionale.

COMPARISON OF MIDREGIONAL PRO-ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE (MR-PRO-ANP) WITH B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE (BNP) IN THE DIAGNOSIS OF NEW-ONSET AND WORSENING OF CHRONIC HEART FAILURE IN PATIENTS HOSPITALIZED FOR ACUTE HEART FAILURE**F-24****E. Stenner¹, M. Merlo², W. Micheli¹, D. Beltrame², A. Buiatti², A. Dragos², A. Di Lenarda², G. Sinagra², B. Biasioli¹**¹Cardiovascular Department, A.O.U, Trieste, Italy, ²Department of Laboratory Medicine, A.O.U, Ospedali Riuniti of Trieste, Italy

Aim of the study. BNP has been largely validated in the diagnosis of acute heart failure (HF) while its reliability for the diagnosis of new-onset HF versus worsening of decompensated chronic HF has not been adequately established. MR-proANP appears to be an accurate tool for the diagnosis of acute HF also in subgroups where BNP or NT-proBNP are difficult to interpret (grey zone). This study aimed to address the usefulness of MR-proANP with respect to BNP in the diagnosis of new-onset versus decompensation of chronic HF in pts hospitalized for acute HF clinically diagnosed.

Methods. BNP test (chemiluminescence assay): Access2 -Beckman Coulter (total %CV range: 2.1–6.7); MRproANP test (time resolved kryptate emission assay): Kryptor - Brahms (total %CV range: 2.5–5.8). 19 consecutive pts, with complete clinical, laboratory and echocardiographic evaluation, hospitalized for acute HF in our Cardiovascular dpt (May 26 to July 02, 2009) were enrolled. The etiology was ischemic heart disease in 7 (36.8%) pts, cardiomyopathies in 3 (15.8%), pericarditis in 1 (5.3%), hypertensive cardiopathy in 3 (15.8%), valvular disease in 5 (26.3%) pts. Atrial fibrillation was present in 7 (36.8%) pts at hospital arrival. 8 cases (42%) had new-onset HF, while 11 cases (58%) had decompensated chronic HF lasting a median of 45 months (range: 1 to 90).

Results: Median age: 68 years (range: 44–82); 11 pts were males (58%), 16 (84%) in NYHA III–IV. Median left ventricular ejection fraction (LVEF) was 37% (range: 15–72); 5 pts (26%) had LVEF <50%. Renal failure (GFR<60 ml/min) was present in 12 (63.2%) and diabetes in 7 (36.8%) cases. During hospitalisation 3 pts has been treated with dobutamine, 1 with enoximone, 1 with levosimendan. Statistical analysis: non parametric test (Mann-Whitney U). Median levels of BNP was 515 (156–1667) pg/mL and it was not significantly different in new-onset HF (538 (305–1667) pg/mL) versus decompensated chronic HF (434 (156–1442) pg/mL). MRproANP also showed a similar trend (median levels of MRproANP: 364 pmol/L (32–988); new onset HF: 288 pmol/L (32–749); decompensated chronic HF: 370 pmol/L (264–988).

Conclusions. Our data suggests that even if MRproANP values, as well as BNP, are elevated in pts with HF, the values don't provide additional information on the time course of HF. However, differently from BNP, MRproANP values tended to be more elevated in decompensated chronic HF with respect to new onset HF.

CATENE LEGGERE LIBERE IN SIERO E URINE: DEFINIZIONE MULTICENTRICA DEI VALORI DI RIFERIMENTO NORMALI, CONFRONTO DEI RISULTATI URINE/SIERO NELLA POPOLAZIONE NORMALE E IN VENTI PAZIENTI EMATOLOGICI

F-25

M. Ruggeri¹, M. Dessi², V. Di Cintio², F. Buccisano³, S. Gumenyuk³, G. Di Cuonzo⁴, F. Bruno⁴, M. Infantino⁵

¹Dip. di Patologia clinica, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Addolorata, Roma; ²Dip. Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma; ³U.O. Ematologia, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma; ⁴Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Microbiologia, Università Campus Bio-Medico, Roma; ⁵Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale S. Pietro-Fatebenefratelli, Roma

Scopo del lavoro: La presenza della Proteina di Bence Jones (BJP) nelle urine è stato ed è segno di rilevanza clinica nella diagnosi e follow-up di malattie di interesse ematologico. Per la ricerca della BJP il Laboratorio dispone accanto all'Elettroforesi e ImmunoFissazione del dosaggio quantitativo ImmunoNefelometrico delle Catene Leggere Libere in urine (u-CLL). Da qualche anno ampia letteratura discute circa l'utilità e il ruolo del dosaggio delle CLL nel siero (s-CLL) in patologie di diverse competenze: ematologica, reumatologica e nefrologica. Lo studio, che è parte di un progetto più ampio, ha focalizzato l'attenzione sulla definizione multicentrica dei valori di riferimento normali delle s-CLL e u-CLL perché questo è l'irrinunciabile punto di partenza per l'interpretazione del risultato interlaboratorio, così da avere valore analitico ben fruibile nella Clinica e che regga al confronto inter-strutturale.

Materiali e metodi: Lo studio, in aperto, ha coinvolto tre strutture di Roma: S. Giovanni Addolorata, Policlinico di Tor Vergata, Policlinico Campus Bio Medico, ed è stato coordinato da un medico esterno ai tre centri che garantisce inoltre il "triplo cieco" raccogliendo ed elaborando i risultati. Sono stati esaminati i campioni siero e urine di 80 soggetti presunti sani e 20 soggetti afferenti all'Ambulatorio di Ematologia del Policlinico Tor Vergata.

Risultati: Nella nostra popolazione di soggetti presunti sani i risultati ottenuti per s-CCL κ sono: Media=1.3mg./dl., DS=3.50, Val.min.=0 mg./dl., Val max= 14.5 mg./dl.; i risultati per s-CCL λ sono invece: Media=1.2 mg./dl., DS=2.1, Val min.= 0.1 mg./dl., Val max= 9.1 mg./dl.

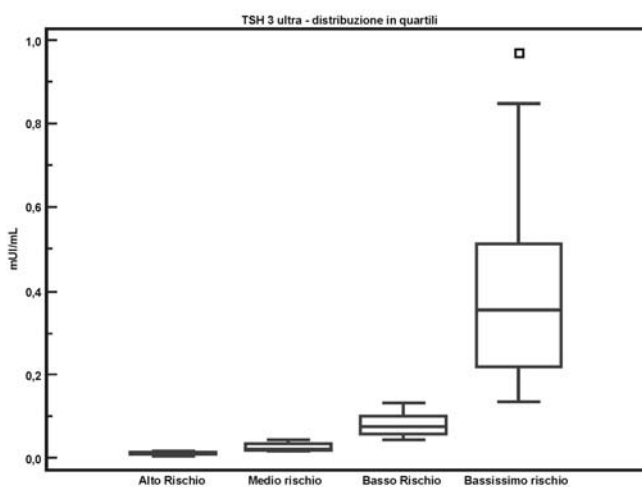
Conclusioni: Nel 10% circa dei soggetti presunti sani si osserva un dato singolo di s-CCL di tipo κ e/o λ anomalo rispetto al resto della popolazione con un rapporto κ/λ normale; è interessante studiare le caratteristiche di questo sottogruppo di sani anomali per trarre delle considerazioni sugli attuali valori normali. All'interno della popolazione ematologica si osserva invece come nella maggior parte dei casi il dato di laboratorio concorda in pieno con la diagnosi clinica; è interessante notare però che alcuni pazienti pur presentando un rapporto κ/λ normale hanno un dato di s-CCL di tipo κ e/o λ "patologico". Da qui ne fuoriesce come il valore di s-CCL di tipo κ e λ rappresenti un valore aggiunto al dato del rapporto s-CCL κ/λ .

VALUTAZIONE MULTICENTRICA DELLE CARATTERISTICHE CLINICHE DEL METODO TSH 3 ULTRA SU ADVIA CENTAUR®

F-26

A. Fortunato¹, M. Caputo², M.G. Spiazzi³, R. Castello³, G. Rossetti¹, L. Bedin¹, G. Da Rin⁴, B. Caruso⁵, A. Ferrari⁵, G. Soffiati¹

¹Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza; ²Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale Orlandi, Bussolengo (VR); ³Endocrinologia, Azienda Ospedaliera, Verona; ⁴Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale San Bassiano, Bassano d/G (VI); ⁵Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale Civile Maggiore, Verona



Scopo del lavoro: nel carcinoma papillare, dopo la chirurgia, è importante la corretta impostazione della terapia farmacologica per limitare la possibilità di malattia secondaria.

Materiali e Metodi: è stata determinata la concentrazione di TSH in 400 pazienti sottoposti a tiroidectomia totale e svuotamento del comparto centrale per carcinoma papillare. I campioni sono stati raccolti in corso di terapia con tiroxina, con dose basata sulla classe di rischio attribuita con l'esame istologico e la stadiazione TNM.

Risultati: la suddivisione dei valori di TSH in quartili ha consentito di associare i pazienti alle seguenti classi: da 0,006 a 0,015, da 0,015 a 0,043, da 0,044 a 0,132 e da 0,135 a 0,970 mUI/mL, con decrescente rischio, in accordo con la stadiazione TNM.

Discussione e Conclusioni: la misura del TSH, con il metodo valutato, potrebbe consentire di titolare la dose di tiroxina in modo più appropriato in base alle classi di rischio.

EXPANSION OF ADVIA ANALYZER REAGENT MENU: VALIDATION OF 6 SENTINEL REAGENTS**G-01****D. Giavarina¹, F. Fabbì¹, F. Fortuna¹, L. Urbani¹, A. Cugini², E. Marelli²**¹Hosp. S. Bortolo, Vicenza - Italy, ²Sentinel CH. SpA, Milan - Italy

Objective: the aim of the study was to verify analytical performance on the SIEMENS ADVIA Clinical Chemistry System and to put on the market a validated CE mark application on Integrated Clinical Chemistry in order to access a broad reagent menu.

Materials/Instruments: the tests evaluated were Ceruloplasmin, α 1Acid-Glycoprotein, Kappa/Lambda light chains (immunoturbidimetric assay), β 2-Microglobulin (immunoturbidimetric assay using microparticles coated with anti-hu B2M) and G6PDH (kinetic measurement of haemolysed whole blood). The reagent used on ADVIA is supplied by SENTINEL CH. Reagent on VISTA or BNII Nephelometer is supplied by Siemens. Instruments were SIEMENS analyzers: 1) ADVIA Systems; 2) VISTA; 3) BNII Nephelometer.

Study Design: CLSI NCLLS protocols were adopted and the performances checked were: on board Reagent and Calibration stability, Limit of Quantification (LOQ), Imprecision (total/within-run), measuring range, comparison against reference method on human sample (Nephelometer for proteins and pHmetry for G6PDH).

Results: LOQ was overall $<1/5.0$ of lower limit of reference range (RR), linearity was always >3.3 upper RR, except Ceruloplasmin (>1.3); min and max within-run/total imprecision, under routine conditions (11 days testing over a 24 calendar period) obtained on three different levels was 0.4-6.8/1.7-8.5 always below "Desirable Specifications For Total Error, Imprecision, And Bias, Derived From Biologic Variation" published by Ricos 2008. The calibration and on board stability was at least 30 days for the overall test.

Comparison: two evaluations were performed: the first classic, using linear regression of average of two replicates on 61 human samples. Results obtained were a slope between 0.731-1.141 and Pearson coefficient 0,8237-0.9921. The second using the Galen/Gambino data analysis method (sensitivity, specificity, predictivity). This method gives concordance between 92-100%.

Conclusion: the combination of SENTINEL Kit performance and low reagent volume consumption allows a widening of the clinical chemistry reagent menu on ADVIA systems, reducing cost for customers.

TROPONINA I ES: VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE DI QUESTO MARCATORE CARDIACO SUL NUOVO SISTEMA VITROS® 5600 INTEGRATED SYSTEM**G-02****B. Milanese, G. Cocchi, E. Bernardi, C. Mancin, S. Maghella, N. Saleri**

Dipartimento di Medicina di Laboratorio-Laboratorio di Patologia Clinica-A.O.Desenzano del Garda (BS)

Scopo dello studio: Fin dagli ultimi mesi del 2008, è in uso presso il nostro Laboratorio un nuovo sistema integrato: il VITROS® 5600 Integrated System della Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY. Il nuovo sistema analitico random access, attraverso 5 differenti tecnologie (microSlide, microTip, microWell, microSensor e Intellicheck technologies) consente l'integrazione di dosaggi di Chimica Clinica, Proteine Specifiche, Droghe, Farmaci ed Immunodiagnostica, abbiamo verificato le performance di alcuni dosaggi in particolare il dosaggio Troponina I ES, confrontandolo con il dosaggio in uso.

Metodi: obiettivo è stato quello di valutare l'imprecisione del dosaggio Vitros Troponin I ES, il suo limite di riferimento al 99° percentile e la correlazione con Dimension XPand® (Siemens). L'imprecisione è stata calcolata in accordo con il protocollo EP5a del CLSI utilizzando 3 livelli di material di controllo (LIQUID QC Cardiac Marker Control VS ®) e verificandone la consistenza con i Ricos goals e le dichiarazioni del produttore. Tutti i risultati sono stati ottenuti utilizzando un lotto reagente e due curve di calibrazione. Il limite al 99° percentile e il CV% di imprecisione è stato calcolato utilizzando campioni provenienti da 238 donatori verosimilmente sani con esclusione di patologie cardiache in accordo con IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage Guidelines. La comparazione tra metodi è stata eseguita in accordo con il protocollo EP9 del CSLI usando 57 campioni di siero (range: 0,002 ng/mL-6,77ng/mL). Il coefficiente di correlazione è stato valutato verso il metodo in uso Dimension XPand® (Siemens).

Risultati: 1. L'imprecisione riscontrata nei tre livelli di QC è risultata (media-CV%): 0,087ng/mL-5,4%; 0,503ng/mL- 4.6%; 5,38ng/mL-2,4%. Risultati in accord con i Ricos goals. 2. La stima del limite di riferimento al 99° percentile in termini di media e CV% è risultata : 0,034 ng/ml – 9,8% 3. L'analisi della correlazione tra il VITROS® 5600 (Y) e il Dimension XPand® (Siemens) (X) è risultata : $Y=0.74X+0,005$; $R^2=0.99$.

Conclusioni: l'imprecisione del dosaggio Vitros Troponin I ES è in accordo con i Ricos Goal. Il dosaggio VITROS® 5600 Troponina I ES correla con il metodo in uso presso il nostro Laboratorio. Il dosaggio Vitros Troponin I ES mostra una migliore sensibilità e una migliore precisione al 99° percentile, rispetto al metodo corrente in uso. L'imprecisione al 99° (<10%) risponde a quanto espresso nelle IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage Guidelines. Per tutte queste ragioni, possiamo concludere che il dosaggio Vitros Troponin I ES può ben adattarsi alle esigenze del nostro Laboratorio.

INTERFERENZA DA EMOLISI SULLA DETERMINAZIONE DELL'AMMONIO PLASMATICO

G-03

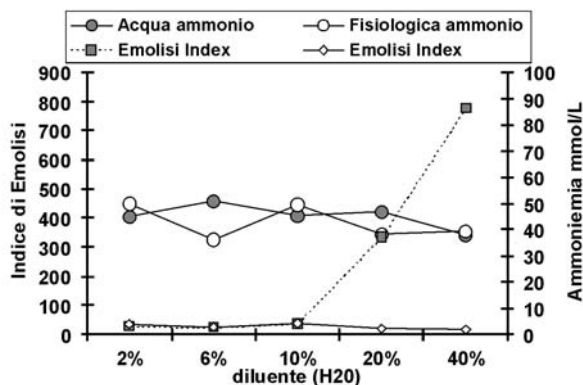
D. Giavarina, L. Urbani, A. Bedin, F. Fortuna, A. Bevilacqua, S. Indico, S. Consolaro, G. Soffiati

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

Scopo del Lavoro. Determinare se e in che misura la determinazione delle concentrazioni di ammonio sono interferite dalla presenza di emolisi nel campione.

Materie e Metodi. Ad aliquote di 500 μ L di un campione fresco di sangue intero, con concentrazione iniziale di 46 μ mol/L sono state aggiunte 10, 30, 50, 100 e 200 μ L di acqua distillata (emolisi) o fisiologica (controllo). I campioni sono stati mescolati e centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti e quindi analizzati con metodo enzimatico su ADVIA 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). L'emolisi è stata misurata con l'indice di emolisi strumentale (lunghezze d'onda: 478/505, 571/596, 658/694 nm). L'ordine temporale di preparazione delle diluizioni e di analisi è stato per campioni appaiati (es. primo 500+10 acqua, secondo 500+10 fisiologica, terzo 500+20 acqua, quarto 500+20 fisiologica, ecc.)

Risultati. La figura mostra le concentrazioni recuperate dal campione e dal controllo, assieme all'indice di emolisi.



Discussione. La valutazione delle interferenze per il dosaggio dell'ammonio è complicata dal fatto che questo costituente tende ad aumentare con il passare del tempo e con l'esposizione all'aria. L'esecuzione tempestiva e sincronizzata delle prove, tra campione e controllo, era condizione necessaria per questo tipo di valutazione. L'emolisi provocata con acqua è divenuta significativa per il 20% di diluente aggiunto, e marcata per H₂O = 40%. Le concentrazioni di ammonio non sono significativamente influenzate dall'emolisi, anche massiva (index > 776; campione laccato). I valori di concentrazione di ammoniemia possono essere rilasciati per qualsiasi livello di emolisi.

CASO CLINICO: LA GAMMOPATIA MONOCLONALE PUÒ INTERFERIRE NELLA DETERMINAZIONE DELLA CREATININA CON METODO ENZIMATICO

G-04

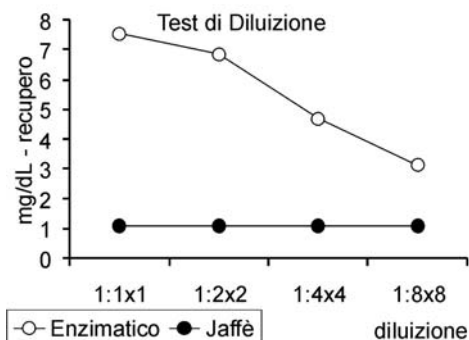
D. Giavarina, C. Schiavotto¹, A. Paternoster, D. Urbani, M.T. Comberlato, S. Consolaro, F. Zerbato, A. Bedin, C. Dalla Valle, G. Soffiati

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia e ¹U.O. Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

Viene riportato un caso di interferenza nel dosaggio della creatinina con metodo enzimatico in un paziente affetto da leucemia linfatica cronica, con sviluppo di una gammopatia monoclonale.

Caso Clinico Paziente maschio di 74 anni, affetto da leucemia linfatica cronica con lieve componente monoclonale (0,5 g/L) di tipo IgM catene K, viene segnalato al laboratorio per concentrazioni di creatinina differenti tra misure effettuate in laboratori diversi ed elevate e crescenti presso il nostro laboratorio, senza corrispondenza con la clinica (12/02/2008: 2,21 mg/dL; 23/04: 3,12 mg/dL; 17/11: 5,62 mg/dL; 23/12: 7,52 mg/dL). In concomitanza dei primi riscontri si registra la comparsa di una nuova componente monoclonale di lieve entità, di tipo IgG-K. Risultano aumentate: VES, Aptoglobina, LDH, Immunoglobuline IgM.

Studio dell'interferenza. La creatinina è determinata con reagenti Siemens su strumentazione ADVIA 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). È stato eseguito un test di diluizione del campione, che ha dato i seguenti risultati: 1:1x1 7,52 mg/dL; 1:2x2 6,86 mg/dL; 1:4x4 4,68 mg/dL; 1:8x8 3,12 mg/dL. La concentrazione di creatinina è stata quindi determinata con metodo colorimetrico secondo Jaffè (Siemens, Dimension RXL system), su campione non diluito: 1,1 mg/dL. La concentrazione si conferma invariata nelle diluizioni a raddoppio (1/2, 1/4, 1/8).



Discussione. Il test di diluizione dimostra la riduzione dell'interferenza proporzionale alla diluizione del campione: si conferma la presenza di interferenti al dosaggio enzimatico della creatinina. Il dosaggio colorimetrico (Jaffè) non è interferito. L'interferenza da proteine monoclonali su test colorimetrici o enzimatici eseguiti su autoanalizzatori di chimica clinica è un evento non frequente. Sono stati riportati alcuni casi di interferenza per creatinina, urea, bilirubina, fosfato, calcio, acetaminofene, ferro, emoglobina e proteina C reattiva. Tra i vari metodi della misura della creatinina, il metodo enzimatico è il meno interessato a fenomeni di interferenza. Questo rende ancora più insidiosa e pericolosa la possibile interferenza e suggerisce cautela nei pazienti con gammopatie monoclonali che presentino differenze critiche nei dosaggi di creatinina o inspiegati elevati livelli di concentrazione di questo analita.

ANALISI DI SOSTANZE D'ABUSO: L'AFFIDABILITÀ DEL DATO ANALITICO NEI CONFRONTI DELL'ADULTERAZIONE DEL CAMPIONE DIAGNOSTICO

G-05

S. Mingardo, M. Ercolin, M. Pavanello, T. Zorzan, K. Guerra, G. Paccagnella, F. Manoni

Medicina di Laboratorio Ospedale Civile di Monselice (PD)ULSS 17

Scopo del lavoro. I test per abuso di droghe sono sempre più richiesti con finalità legali e/o fiscali, pertanto è necessario verificare la possibile adulterazione del campione per negativizzare i test di laboratorio. Abbiamo voluto, pertanto, valutare la risposta di tali test anti-adulterazione del campione urinario, in relazione alla concentrazione della sostanza adulterante capace di mascherare la droga presente nell'urina.

Materiali e metodi. Per lo studio è stato usato un campione urinario, positivo alle principali droghe d'abuso, ottenuto da alcuni campioni positivi. La positività di questo campione è stata verificata mediante saggio immunoenzimatico (EIA) - metodo CEDIA- della ditta Olympus per amfetamine-ecstasy, benzodiazepine, cannabinoidi, cocaina, oppiacei e dosaggio della creatinina. Aliquote del medesimo campione sono state adulterate in modo da ottenere una concentrazione per la glutaraldeide di 0.1%, 0.05%, 0.01% e 0.001%, per l'ipoclorito di 0.1%, 0.01%, 0.001% e 0.0002%, per l'acqua ossigenata di 1%, 0.5%, 0.1% e 0.01%, per il nitrito di 100 mg/dl, 30 mg/dl e 10 mg/dl. Tali aliquote sono state esaminate con il test rapido "Strisce test adulterazione urine" della ditta Intermedical e distribuite dalla ditta Syntesys di PD per la determinazione semi-quantitativa della creatinina (CRE), nitriti (NIT), glutaraldeide (GLUT), pH, peso specifico (SG) e ossidanti (OXI).

Risultati. La presenza di GLUT nell'urina, allo 0.1% negativizza in modo netto la ricerca di tutte le droghe, ma non le benzodiazepine per $GLUT \leq 0.05\%$. Il nitrito elimina decisamente la presenza dei cannabinoidi, ma solo a concentrazioni urinarie > 10 mg/dl. L'ossidazione con ipoclorito maschera decisamente tutte le droghe presenti nell'urina, anche a concentrazioni $< 0.001\%$, ma $> 0.0002\%$, mentre con l'acqua ossigenata questo avviene a valori $> 0.1\%$, ma senza eliminare mai, alle varie concentrazioni studiate la presenza della benzodiazepina.

Discussione e conclusioni. Questo test rapido per la ricerca di sostanze adulteranti i campioni urinari da sottoporre al test per la ricerca delle droghe d'abuso, rappresenta senz'altro un valido ausilio nell'ambito della lotta alle dipendenze. I risultati delle prove del nostro lavoro non solo confermano le indicazioni date dal produttore delle strisce, ma aggiungono ulteriori importanti evidenze della concentrazione necessaria alla negativizzazione del test.

CONFRONTO TRA IL METODO DI JAFFE' E METODO ENZIMATICO PER IL DOSAGGIO DELLA CREATININEMIA

G-06

M. Riva, M. Daves¹, J. Beltrame, I. Caligiuri, V. Zorzi, S. Platzgummer

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche Ospedale di Merano, ¹Laboratorio di Biochimica Clinica Ospedale di Bolzano, Azienda Sanitaria dell'Alto Adige

Scopo del lavoro: la determinazione della creatinina sierica viene effettuata per valutare la funzionalità renale, soprattutto per valutarne la capacità filtrante. Purtroppo la creatinina non è un indicatore precoce di perdita di tale funzionalità. Per questo motivo, a livello internazionale, viene raccomandata la valutazione della capacità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR): ottenuta attraverso una formula MDRD, recentemente validata, che permette di esprimere il valore eGFR mediante un semplice calcolo matematico. Con questo lavoro abbiamo voluto verificare il grado di concordanza tra le misure della creatininemia ottenute con due metodiche differenti: quella utilizzata attualmente dal nostro laboratorio (metodo di Jaffé compensato) e quella basata su metodologia enzimatica. La finalità dello studio è di introdurre la metodica enzimatica nella determinazione della creatininemia, come raccomandato recentemente a livello di società scientifiche di laboratorio e nefrologia, per poter refertare la eGFR secondo la formula MDRD.

Materiali e metodi: il confronto tra le due metodiche è stato eseguito su 851 campioni consecutivi di siero. I valori ottenuti vanno da un minimo di 0.26 mg/dl a un massimo di 8.83 mg/dl (media \pm SD: 1.14 ± 0.97 mg/dl) per il metodo enzimatico colorimetrico e da un minimo di 0.32 mg/dl a un massimo di 8.68 mg/dl (media \pm SD: 1.13 ± 0.95 mg/dl) per il metodo di Jaffé. Tutte le determinazioni sono state eseguite su strumento Modular SWA Roche/Hitachi. I risultati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il Bland-Altman plot. Per verificare la presenza di una differenza tra i due gruppi di valori ottenuti è stato eseguito il T-test.

Risultati: dalla valutazione dei dati risulta una differenza statisticamente significativa ($p < 0.001$) con intervallo di confidenza $-0.015 - -0.008$. Inoltre dal Bland-Altman plot si evidenzia un bias medio in percentuale dell'1% (limiti di concordanza compresi tra -10.8% e 8.9%).

Discussione e conclusioni: dai dati ottenuti, da questo studio, si evidenzia che c'è una differenza statisticamente significativa tra i valori della creatininemia, ottenuti con le due metodiche utilizzando lo stesso analizzatore. Ma tale differenza è minima, con poca rilevanza clinica (vedi intervallo di confidenza): quindi l'uso di una metodica (Jaffé compensata) rispetto all'altra (enzimatica colorimetrica) non sembrerebbe incidere negativamente sul calcolo del valore di eGFR.

VALUTAZIONE PRELIMINARE DI UN NUOVO METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-ACh-R

G-07

L. Cinquanta, R. Sinno

Servizio di Patologia Clinica Azienda Ospedaliera Universitaria Città d'Ippocrate Salerno

Scopo del lavoro. La Miastenia Grave (MG) è una malattia autoimmune relativamente rara (200-400 casi/milione) generata da autoanticorpi diretti contro proteine coinvolte nella trasmissione del segnale a livello della giunzione neuromuscolare. La diagnosi di tale patologia si basa sul quadro clinico, test elettrofisiologici e si avvale della determinazione sierica di anticorpi anti-recettore nicotinico dell'acetilcolina (anti-ACh-R). Il dosaggio degli anticorpi anti-ACh-R viene eseguito, attualmente, con un test di radioimmunoprecipitazione (RIPA) basato sull'utilizzo di ACh-R da muscolo scheletrico umano marcato con ¹²⁵I-bungarotossina, per questo dosaggio "resiste" l'impiego di radioisotopi, in controtendenza con gli altri settori della biochimica-clinica. Nell'ambito di un programma di progressiva sostituzione delle metodiche analitiche radioisotopiche, abbiamo iniziato la valutazione di un nuovo metodo immunoenzimatico per la determinazione degli anticorpi anti-ACh-R per verificare la possibilità d'utilizzarlo come metodo analitico di routine al posto di quello RIPA in uso.

Materiali e Metodi. Sono stati selezionati 16 campioni di siero di pazienti affetti da Miastenia Grave (MG), di cui 13 sieropositivi e 3 sieronegativi per la ricerca di ab anti-ACh-R, e 48 soggetti di controllo, inclusi tra essi vi erano pazienti con varie malattie neurologiche ed autoimmuni. Le determinazioni degli ab anti-ACh-R sono state eseguite con un test ELISA, basato sulla capacità degli ab anti-ACh-R di competere con 3 differenti anticorpi monoclonali anti ACh-R (MAbs 1-3) per i siti di legame presenti sui recettori dell'acetilcolina, sia nell'isoforma fetale che in quella dell'adulto, purificati per affinità. Il Kit è prodotto da RSR Limited di Cardiff (GB) ed è distribuito in Italia da Delta Biologicals di Pomezia-Roma cod. I-541.

Risultati. Una prima analisi dei dati mostra una buona correlazione tra le metodiche RIPA ed ELISA per la ricerca degli ab anti-ACh-R ($r = 0.87$; $n = 64$; $p < 0.001$): 12/13 pazienti con MG, già positivi con il test RIPA, sono risultati positivi con quello ELISA, mentre un campione è risultato positivo con il test ELISA (> 0.45 nmol/L) ma negativo con il metodo RIPA. Infine, tutti i 48 soggetti di controllo che erano risultati negativi per la ricerca di ab anti-ACh-R con il metodo RIPA mostravano valori d'inibizione uguale o inferiore < 0.45 nmol/L con il metodo ELISA.

Discussione e Conclusioni. I primi risultati ottenuti e la relativa semplicità del metodo immunoenzimatico, rispetto alla metodologia RIPA correntemente utilizzata per la ricerca degli ab anti-ACh-R, indicano che il test ELISA in valutazione può rappresentare un possibile strumento diagnostico alternativo per la Miastenia Grave. Inoltre, la procedura analitica sperimentata, essendo da una parte potenzialmente automatizzabile e dall'altra non vincolata all'uso e detenzione di radioisotopi, può essere utilizzata da un numero più ampio di laboratori clinici e contribuire ad un aumento dei casi di MG diagnosticati, oggi considerati sottostimati.

CRITICITA' NEL DOSAGGIO DELL'HbsAg ED AZIONI CORRETTIVE

G-08

G.V. Melzi d'Eril¹, R. Baccalini², A. Mauri², W.P. Porreca², D. Sotgia², G. Pasolini², M. Gallozzi²

¹Dipartimento di Medicina Chirurgia e Odontoiatria, A.O. San Paolo, Università degli Studi di Milano, Milano. ²Laboratorio Analisi, A.O. San Paolo, Milano

Scopo dello studio. L'antigene di superficie dell'epatite B (HbsAg) è l'indicatore più importante di tale infezione. Scopo del presente lavoro è la valutazione del dosaggio dell'HbsAg con metodo HbsAg II (Roche).

Materiali e metodi. Il suo dosaggio presso il laboratorio dell'A.O. San Paolo di Milano viene effettuato inizialmente mediante test HbsAgII, (metodo 1), (cut-off ≥ 1.0 , zona grigia 0.90-0.99) su Modulo E170 (Roche) e i campioni dubbi e positivi mediante HbsAg ULTRA e CONFIRMATION, Biomerieux (metodo 2), (cut-off 0.13), su Vidas (Biomerieux).

Risultati. Nel periodo ottobre 2008-giugno 2009 sono stati eseguiti 6676 dosaggi col metodo 1. Di questi, 606 (9%) sono risultati dubbi e quando rivalutati col metodo 2 sono risultati negativi con una "media indice" compresa tra 0.01 e 0.02. Inoltre, 64 campioni sono risultati positivi col metodo 1, con indice compreso tra 1.5 e 100; due di questi rivalutati col metodo 2, con indice rispettivamente di 5.0 e 19.8, sono risultati nettamente negativi. Nello stesso periodo non si sono verificati falsi negativi.

Discussione. Per ovviare all'elevato numero di ripetizioni ottenute con il metodo 1, sono state poste in atto alcune azioni correttive sull'analizzatore Modulo E170: la sostituzione delle celle di lettura e del sistema idraulico ogni 6 mesi di attività e non ogni anno come da protocolli consigliati dall'assistenza tecnica. Inoltre, si è promossa la separazione fisica dei test per HbsAgII e HBS per escludere il possibile trascinarsi dei reagenti. Tali operazioni hanno portato un decremento del cut-off per un periodo temporaneo con una "media indice" per i campioni negativi inizialmente compresa tra 0.60 e 0.80 (0.2% ripetizioni per conferma) che con il passare del tempo aumentava fino a 0.90 (14% ripetizioni per conferma) dopo qualche mese. Nello stesso periodo non si aveva la conferma del 3% dei risultati positivi.

Conclusione. La metodica usata per il dosaggio dell'HbsAg (metodo 1), pur non producendo nessun falso negativo, ha rilevato un numero elevato di falsi positivi e/o dubbi con notevole dispendio di risorse per la conferma e per interventi tecnici. Si auspica che il metodo venga migliorato a vantaggio dell'economia dell'Azienda e della serenità degli operatori.

Bibliografia

Muhlbacher A., et al. Med. Microbiol. Immunol. 2008;197:55-64.

PERCORSI DIAGNOSTICI DIPARTIMENTALI: SCREENING PER LA CITOLOGIA URINARIA**G-09****F. Manoni, P. Cocco, M. Ercolin, L. Fornasiero, A. Tinello, T. Zorzan, A. Farruggio, A. Ferro**

Dipartimento Patologia Clinica Az. ULSS17-Este Regione Veneto

Scopo del lavoro. La tecnica di Papanicolau è ancora oggi utilizzata nella diagnosi e nel monitoraggio delle neoplasie uroteliali: esame non invasivo, ben accettato dal paziente; tuttavia ha bassa sensibilità (34-66%) nei tumori vescicali. La probabilità pre-test è normalmente molto bassa: nella nostra realtà è circa dello 0,5%. Per questi elementi abbiamo valutato l'utilità di una selezione dei campioni citologici con un test di imaging automatizzato (iQ200). Lo scopo del nostro lavoro è verificare la sensibilità e il VPN del test per lo screening citologico automatizzato.

Materiali e metodi. 823 campioni urinari con conservante per citologia afferenti al Dipartimento di Patologia Clinica sono stati suddivisi in due aliquote ed analizzate in doppio cieco. Una aliquota viene analizzata presso il Laboratorio analisi con iQ200, sistema di acquisizione-analisi d'immagini. L'analisi mediante rete neurale classifica gli elementi in 12 categorie: RBC, WBC, cellule epiteliali squamose e non etc. I criteri per la selezione dei campioni sono: uno scoring >6 basato su ematuria, leucocituria, cellularità ed una valutazione degli UNCL in base ad elementi morfologici atipici: forma, dimensione e contenuto non classificabili dalla rete neurale dell'iQ200. La seconda aliquota è avviata in Anatomia Patologica per la citologia: centrifugazione a 1600 g per 10', precipitato risospeso in 1ml, centrifugazione a 600 g per 15' con citocentrifuga. Il vetrino fissato, asciugato, colorato (Papanicolau) e letto al microscopio a 400 X.

Risultati. Su 823 campioni analizzati con iQ200 212 (26%) hanno evidenziato uno score > 6 e/o la presenza di elementi UNCL atipici; 611 (74%) hanno evidenziato uno score <6 e UNCL negativi. Su 823 campioni la citologia ha evidenziato 4 (0,5%) positivi e 819 (99,5%) negativi. Tutti i 4 positivi avevano uno score > 6 e presenza di UNCL atipici. Nessuno dei campioni con score < 6 e UNCL - aveva una citologia positiva. Le citologie positive hanno avuto conferma con ulteriori indagini.

Discussione e conclusione. Le neoplasie vescicali superficiali e/o infiltranti hanno un quadro clinico con ematuria, spesso macroscopica, cellule atipiche relate al carattere erosivo e/o esfoliante della neoplasia. La citologia a fronte di eccellente specificità (88-100%) vanta sensibilità modesta (34-66%) e notevole impiego tempo/operatore. La probabilità pre-test molto bassa (0,5%) rende particolarmente vantaggioso l'approccio tramite sistema automatizzato per ridurre l'impegno-operatore focalizzandolo sui casi selezionati: il processo intrapreso ha una ottima sensibilità e VPN (100%) pur riducendo drasticamente del 74% il numero dei campioni da sottoporre ad esame citologico. Si ritiene utile proseguire la sperimentazione.

DETERMINAZIONE DELLO IODIO URINARIO CON METODICA AUTOMATIZZATA SU UNA POPOLAZIONE DI ADOLESCENTI NELLA VAL DI PESA**G-10****O. Antelmo¹, L. Rossi², R. Ciuti¹**¹Laboratorio Generale, Settore Farmacotossicologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze; ²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Ospedale S. Chiara, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

Scopo del lavoro: Lo iodio è un elemento essenziale per assicurare il normale accrescimento ed il benessere umano. La sua maggiore fonte è rappresentata dalla dieta, tuttavia il contenuto negli alimenti è molto variabile e dipende dalla sua presenza nel terreno e nell'acqua. Secondo l'Istituto Superiore di Sanità, il 10% dei ragazzi in età scolare del Centro-Nord ed il 20% delle regioni meridionali ed insulari è iodio-carente. Per tale motivo è utile effettuare uno screening sui ragazzi, per individuare precocemente eventuali carenze. In questo studio abbiamo avuto la possibilità di dosare la ioduria in 1000 adolescenti delle scuole medie di una zona interna della Toscana (Val di Pesa) e valutare se la metodica in uso nel nostro laboratorio fosse adatta per uno studio epidemiologico sulla popolazione.

Materiali e metodi: Gli studenti, dopo la visita medica, hanno consegnato, previo consenso informato, un campione di urina del mattino per l'analisi dello iodio. Il metodo per la determinazione della ioduria è quello di Sandell Kolthoff, da noi adottato ed ottimizzato su analizzatore automatico (ADVIA 2400 - Siemens). I due reagenti utilizzati per la determinazione sono costituiti da una soluzione di As(III) ed una soluzione di Ce(IV) di colore giallo. Ogni campione viene analizzato in doppio, dopo un pretrattamento che consiste nell'aggiunta in provette di vetro con tappo a vite (contenenti campioni e standard) di una soluzione acida di Persolfato di Ammonio, seguita da una incubazione per 30 minuti a 100°C. Per ogni seduta vengono inserite 2 urine di controllo (Biorad) per la verifica della precisione intra-serie. I risultati della ioduria vengono refertati rapportati alla creatinuria, con range di normalità tra 50 a 150 µg/gCr, come consigliato dalla letteratura.

Risultati: Gli studenti controllati sono stati 1000, di cui 524 femmine e 476 maschi, di età compresa tra gli 11 ed i 14 anni. La media dei valori della ioduria rapportata alla creatinina nella femmine è stata 96,891 µg/gCr, DS 76,212, mentre nei maschi è stata 102,700 µg/gCr, DS 88,894.

Discussione e conclusioni: Selezionando i valori di ioduria al di fuori del range di normalità sono risultati ben 229 i ragazzi sottolivello (22,9%), mentre 168 avevano valori >150 µg/gCr; dal nostro studio emerge una considerevole incidenza di adolescenti iodio-carenti, mentre i valori elevati riscontrati in alcuni studenti si possono spiegare con l'uso non del tutto appropriato del sale iodato come integratore. Infine abbiamo verificato come il metodo applicato sull'ADVIA 2400 possa risultare funzionale per uno screening sulla popolazione.

VALUTAZIONE MULTICENTRICA DELLE CARATTERISTICHE ANALITICHE DEL METODO TSH 3 ULTRA SU ADVIA CENTAUR®

G-11

A. Fortunato¹, M. Caputo², L. Furlani³, R. Castello⁴, G. Rossetini¹, L. Bedin¹, G. Da Rin⁵, B. Caruso⁶, A. Ferrari⁶, G. Soffiati¹

¹Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza; ²Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale Orlandi, Bussolengo (VR); ³Medicina Generale, Ospedale Sacro Cuore Don Calabria, Negrar (VR); ⁴Endocrinologia, Azienda Ospedaliera, Verona; ⁵Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale San Bassiano, Bassano d/G (VI); ⁶Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale Civile Maggiore, Verona

Scopo del lavoro: tutte le principali linee guida considerano la misura del TSH come base nella diagnosi e monitoraggio delle patologie tiroidee. L'incremento della sensibilità dei metodi di determinazione del TSH ha consentito di migliorare in modo considerevole l'utilità di questo parametro. In questo lavoro è stata valutata la sensibilità di un nuovo metodo secondo il documento CLSI EP17-A ed il confronto dei risultati ottenuti, con il metodo precedentemente commercializzato per lo stesso sistema analitico, in un campione con numerosità significativa.

Materiali e Metodi: sono stati valutati i reagenti TSH-3 ultra su ADVIA Centaur® (Siemens, Tarrytown USA). I parametri per la definizione della sensibilità sono stati determinati misurando 60 replicati di un diluente (LoB = limit of blank) e 20 replicati di 7 campioni con concentrazioni comprese tra 0,002 e 0,023 mUI/L (LoD = limit of detection e LoQ = limit of quantitation). Per il confronto dei metodi il TSH è stato determinato in 997 campioni di soggetti, non ospedalizzati e che non riferivano precedenti patologie tiroidee, con i reagenti TSH-3 ultra e TSH-3 sullo stesso sistema analitico. La popolazione considerata era composta da 726 donne (età media 48 anni, min 6 - max 83) e 271 uomini (età media 53 anni, min 10 - max 86).

Risultati: la valutazione della sensibilità ha dimostrato le seguenti concentrazioni: LoB = 0,0006 mUI/L, LoD = 0,003mUI/mL e LoQ = 0,008 mUI/mL (stabilendo un errore totale del 20%). Il confronto con i risultati ottenuti con il metodo precedentemente in uso è descritto da una retta di regressione secondo Passing e Bablok con la seguente espressione: $y=0,98x-0,01$ (95% IC: pendenza 0,97-0,99, intercetta -0,03 - +0,0004). È stata valutata inoltre la distribuzione delle concentrazioni di TSH nella popolazione considerata e non sono state rilevate differenze significative degli intervalli di riferimento calcolati per i due metodi, anche stratificando i campioni in base al sesso, pur essendo più bassa di un ordine di grandezza la minima concentrazione misurata con i due metodi (rispettivamente 0,040 e 0,005 mUI/mL).

Discussione e Conclusioni: la verifica che la sensibilità clinica dei reagenti TSH-3 ultra è di 0,008 mUI/mL, corrispondente a quanto dichiarato dal produttore, consente di classificare il metodo in esame di terza generazione.

CONFRONTO TRA RISULTATI OTTENUTI DA PRELIEVO VENOSO E DA AGOCANNULA. STUDIO PRELIMINARE

G-12

C. Lazzi¹, M. Miatton¹, F. Sirianni¹, C. Bramuzzo², F. Nascig², B. Della Vedova¹, S. Demontis¹, L. Strizzolo²

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ASS N°5 Bassa Friulana - Ospedale di Palmanova; ²Area Emergenza - Palmanova

Scopo del lavoro: Comparare i valori ottenuti da prelievo venoso classico e agocannula a dimora e valutare se questi ultimi risultino idonei per l'analisi. Ciò per ridurre al minimo il disagio sia dei pazienti che degli operatori, e per evitare la necessità di un secondo prelievo.

Materiali e metodi: Sono stati esaminati 143 campioni provenienti da pazienti ricoverati in Area d'Emergenza e in O.T. i Pronto Soccorso, con accesso venoso difficile, secondo i seguenti criteri: pazienti maggiorenni e in grado di esprimere il proprio consenso per l'ammissione allo studio, soggetti sottoposti a prelievi venosi seriatati per l'analisi della curva delle troponine, uso di agocannula di calibro > 20 G, pazienti sottoposti a precedenti infusioni endovenose, attraverso via venosa di riferimento. I campioni di sangue venoso sono stati raccolti in doppio, mediante accesso venoso classico e prelievo da agocannula in provette Vacuette. Su Advia 1650 Siemens sono stati testati: glucosio, urea, creatinina, elettroliti, transaminasi; l'emocromo è stato eseguito su Advia 2120; PT e APTT su Sta(R) Evolution Roche; TnI e CKMBm su Advia Centaur Siemens.

Risultati: Sono state calcolate le correlazioni tra le coppie di risultati e confrontati i valori di prestazione con quelli reperibili in letteratura come valori ottimali e come desiderabili (accettabili) per i CQ dei singoli analiti (es.sito www.westgard.com). Dall'analisi dei dati si può desumere che:

1) i valori di correlazione tra i due tipi di prelievo risultano buoni, con $R > 0,95$ per tutti gli analiti e le attività, tranne che per Na e K; 2) Urea, transaminasi, TnI, INR, RBC, WBC e PLT forniscono valori di accuratezza in linea con quanto riportato in letteratura per valori ottimali, anche se i valori di TnI sono confinati in un range di valori molto bassi; 3) Na, Cl, glucosio, creatinina, Hb ed HCT risultano accettabili, anche se più elevati dei valori ottimali; 4) K e CKMBm risultano non accettabili.

Discussione e conclusioni: Se dal punto di vista della pratica di laboratorio le differenze tra i valori ottenuti sembrerebbero molto basse, l'applicazione di un modello statistico matematico dimostra che tali differenze risultano più marcate per K e CKMBm. Ciò potrebbe essere dovuto, relativamente al K, alla presenza di emolisi di varia intensità che deriva da un prelievo difficoltoso. Più difficile risulta valutare la discrepanza sui valori di CKMBm. Da questo studio preliminare sembrerebbe che il prelievo da agocannula possa essere tranquillamente utilizzabile qualora l'accesso venoso sia di difficile accesso, sempre valutando i risultati in maniera critica.

LA POSTA PNEUMATICA COME CAUSA DI EMOLISI

G-13

F. Zerbato, A. Bevilacqua, G. Rossetti, A. Tomasini, B. Faresin, U. Pizzolato, F. Fabbi, L. Scarparo, G. Mezzena, D. Giavarina

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia e Servizio di Pronto Soccorso, Ospedale San Bortolo, Vicenza

Scopo dello studio. L'emolisi è una delle cause maggiori di rigetto dei campioni di sangue. Nella nostra esperienza la percentuale di campioni emolizzati è maggiore per alcuni reparti e per i campioni inviati con posta pneumatica (campioni STAT). Abbiamo voluto verificare se e in che entità tale modalità di invio sia causa di questo problema preanalitico.

Metodi. Due provette di sangue 13x100 ml con litio-eparina e gel separatore (BD Vacutainer® PST™II; BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA) sono state raccolte in venti soggetti volontari per ogni stazione di posta studiata. Una provetta è stata processata direttamente in Laboratorio, mentre l'altra è stata inviata al laboratorio attraverso una delle tre stazioni di posta scelte, selezionata sulla base della distanza (Stazione 1 > 500 m.; St. 2 ~ 350m.; St 3 <100m.). Su ogni campione sono state misurate le concentrazioni di Potassio, LDH e AST, oltre all'indice di emolisi (HI), (ADVIA 2400, Siemens, Tarrytown, NY).

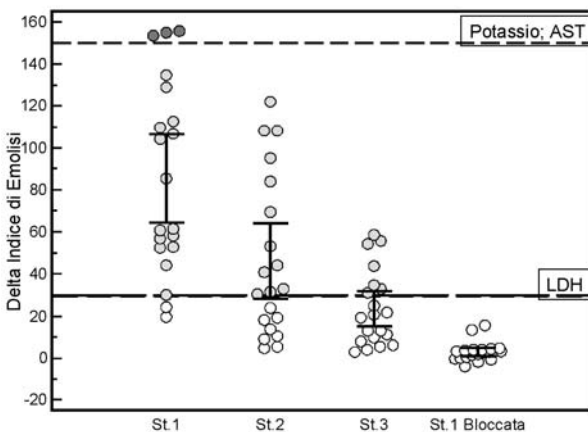


Figura. Incremento di emolisi determinato dall'invio con posta pneumatica.

Successivamente, dalla stazione con media di emolisi maggiore, sono state inviate altre 20 provette, bloccate all'interno del bossolo con gomma piuma, al fine di impedirne l'urto contro le pareti durante le accelerazioni e decelerazioni. I risultati sono stati analizzati per dati appaiati (MedCalc® 10.1.6.0).

Risultati. L'indice di emolisi medio per i campioni inviati dalla St. 1 era di 92,2 (95% CI 71,7-112,6), mentre per i corrispettivi campioni afferiti direttamente in laboratorio era 5,3 (4,2-6,5); per la St 2: 50,7 (34,4-67,0) vs 7,8 (4,3-11,2); per la St 3: 29,0 (20,5-37,4) vs 5,5 (3,2-7,9). L'invio con campioni bloccati dalla St. 1 ha mostrato emolisi media di 7,7 (5,5-9,9) vs 4,3 (2,9-5,7). Nella figura sono rappresentati gli incrementi di emolisi.

Conclusioni. La posta pneumatica causa un aumento variabile di emolisi nei campioni, diverso a seconda dei percorsi, talora di entità tale da determinare l'inidoneità del campione (HI accettabili per LDH<50; per potassio e AST <150). Il bloccaggio delle provette all'interno del bossolo annulla completamente il problema.

VALUTAZIONE DELL'EMOLISI AGOCANNULA DIPENDENTE: COMPARAZIONE DI MATERIALI

G-14

D. Giavarina, L. Pasquale¹, G. Mezzena, V. Riboni¹, S. Indico, A. Tomasini, L. Scarparo, D. Urbani, L. Bedin, G. Soffiati

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia e ¹Servizio di Pronto Soccorso, Ospedale San Bortolo, Vicenza

Scopo dello studio. E' noto che il prelievo attraverso agocannule è associato a maggior emolisi rispetto al prelievo con ago. L'uso di agocannule è comunque preferito dai servizi di Pronto Soccorso e di emergenza in genere, per la riduzione degli accessi venosi necessari alla gestione del paziente. Ciò determina, per questi reparti, elevate incidenze di campioni emolizzati. Non sono noti studi sui materiali utilizzati e se tali materiali possono spiegare alcune differenze sull'emolisi di campioni di sangue differenti, raccolti con lo stesso sistema. Scopo di questo lavoro è verificare la relazione tra tipo di prelievo, materiale utilizzato e percentuale di campioni non idonei per emolisi, comparando diverse agocannule tra loro.

Metodi. Sono state osservate le percentuali di campioni non idonei per emolisi in pazienti afferenti dal Pronto soccorso, durante un periodo di 78 giorni consecutivi. Sono stati comparati: 91 campioni ottenuti con agocannula BD Insite™

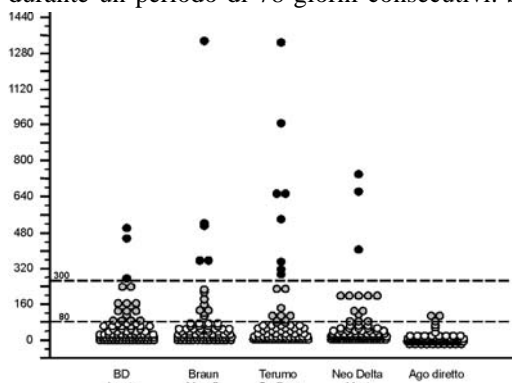


Figura. Indici di emolisi per i diversi dispositivi.

Autoguard™ (gruppo A), 92 con agocannula B Vasofix® Safety (gruppo B), 90 con agocannula Terumo Surflo-w (gruppo C) e 90 con agocannula Neo Delta Ven T (gruppo D), tutti di gauge 18. La misura dell'emolisi è stata effettuata attraverso la determinazione fotometrica dell'indice di emolisi, su analizzatore automatico (ADVIA 2400, Siemens, Tarrytown, NY). Come gruppo di controllo sono stati utilizzati 100 prelievi consecutivi diretti ottenuti mediante ago gauge 21 e holder diretto provenienti dalla Rianimazione dello stesso ospedale.

Risultati. I pazienti che hanno partecipato allo studio sono stati complessivamente 463. Nel gruppo A sono risultati emolizzati 19 campioni su un totale di 83 (22,9%); nel gruppo B, 14 campioni su 77 (18,2%); nel gruppo C, 17 campioni su 74 (23,0%); nel gruppo D, 14 campioni su 87 (16,1%). I campioni raccolti con il sistema Vacutainer diretto hanno avuto una percentuale di inidoneità del 3,0%.

Conclusioni. Tutti i tipi di agocannule presi in esame mostrano elevate percentuali di campioni emolizzati rispetto al prelievo classico. Si sono riscontrate alcune differenze percentuali di emolisi, tra le diverse agocannule, che non hanno però raggiunto la significatività statistica. Questo lavoro è limitato dal possibile effetto emolitico della posta pneumatica, utilizzata per l'invio dei campioni. I dispositivi agocannula tuttavia si confermano generalmente non idonei per il prelievo venoso.

IMPIEGO DELLO STRUMENTO SYSMEX XT-2000I NELLO STUDIO DEI LIQUIDI BIOLOGICI**G-15****G. Vignola, S. Brindisi, R. Beneventi**

U.O.S. Laboratorio d'Urgenza A.O. "San Carlo" Potenza

Introduzione: La richiesta di indagini qualitative e quantitative inerenti la composizione cellulare di liquidi quali CSF, pleurico, ascitico e pericardico, è un'evenienza abbastanza frequente nei Laboratori di Urgenza. Tale tipo di analisi viene, attualmente, condotto con metodi manuali che comportano un notevole dispendio di tempo e di risorse, ma soprattutto presentano scarsa standardizzazione, variabilità e limiti legati sia alla preparazione del campione che alla soggettività dell'operatore.

Scopo del lavoro: Il lavoro si prefigge di valutare l'affidabilità e l'attendibilità dei dati forniti dallo strumento SYSMEX XT-2000I, relativamente alla conta dei globuli bianchi (WBC) in diversi tipi di campioni di liquidi biologici.

Materiali e Metodi: Il nostro studio, condotto in 11 mesi, ha preso in considerazione 165 campioni: 98 pazienti di sesso maschile e 67 di sesso femminile, di età compresa tra i 4 e i 90 anni. Sono stati esaminati 101 liquidi pleurici, 30 CSF, 13 liquidi ascitici, 11 liquidi pericardici, 5 liquidi addominali, 8 liquidi di drenaggio. La provenienza dei campioni esaminati comprende i Reparti del Dipartimento di Cardiologia (UTIC, Cardiologia medica, Cardiochirurgia) per quanto attiene ai campioni di liquido pleurico e pericardico; Ematologia, Infettivi e Neurologia per i campioni di CSF; Medicina e Geriatria per i liquidi ascitici; Chirurgia Generale e Chirurgia d'Urgenza per i campioni di liquido pleurico, addominale e di drenaggio. N° 3 campioni, di cui 2 liquor ed un liquido pleurico, sono pervenuti dalla U.O. di Pediatria. L'analisi è stata condotta mediante SYSMEX XT-2000I in citofluorimetria su campioni raccolti in provette prive di anticoagulanti o conservanti, mediante l'utilizzazione della modalità manuale del canale WBC-Diff. specifico dello strumento.

Risultati: Il presente studio ha dimostrato che, per linearità, precisione ed assenza di errori di trascinarsi, il canale WBC-Diff del Sysmex XT-2000I fornisce risultati con un grado di correlazione di oltre il 90% rispetto ai risultati ottenuti con la conta al microscopio, in particolare per valori non estremamente elevati.

Conclusioni: L'analisi al microscopio rappresenta ancora oggi il "Golden Standard" per l'analisi dei liquidi biologici, tuttavia in base ai risultati ottenuti nel presente studio si può affermare che la conta delle cellule nucleate mediante SYSMEX XT-2000I, da un punto di vista clinico, presenta un sufficiente livello qualitativo, tale da poter essere utilizzato, a scopo diagnostico, in regime di urgenza ed in grado di permettere trattamenti efficaci e tempestivi per il paziente.

VALUTAZIONE DI UN NUOVO SISTEMA AUTOMATICO A MICROSFERE PER LA RILEVAZIONE SIMULTANEA DI AUTOANTICORPI NUCLEO-CITOPLASMATICI NELLE MALATTIE REUMATICHE AUTOIMMUNI**G-16****D. Bassetti¹, G. Kodermaz², L. Teste³, C. Nuzzo¹, A. Zappaterra¹, R. Tozzoli²**

¹Microbiologia e Virologia, Struttura Semplice Sierologia Autoimmunità Ospedale S.Chiera, Trento; ²Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Ospedale Civile, Latisana (Ud); ³Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Francia

Scopo del lavoro: Sono state valutate le caratteristiche di un nuovo sistema analitico (BioPlex 2200, BioRad, Hercules, USA) ad alta capacità operativa per la determinazione simultanea di autoanticorpi anti-nucleo e citoplasma in pazienti affetti da malattie reumatiche e in gruppi di controllo.

Materiali e metodi: Sono stati studiati 566 pazienti distinti in 261 soggetti affetti da malattie reumatiche autoimmuni (LES, SSc, SS, PM), 87 soggetti affetti da malattie autoimmuni d'organo (PBC, tiroiditi, celiachia, HAI) e 218 individui di controllo (120 sani, 98 affetti da malattie infettive). E' stato impiegato il sistema analitico BioPlex 2200 utilizzando il reagente ANA Screen, fornito dalla ditta Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette (Francia), che consente la determinazione simultanea di 13 autoanticorpi nucleo-citoplasmatici (dsDNA, cromatina, proteina P ribosomiale, SSA-52, SSA-60, SSB, Sm, Sm/RNP, RNP-A, RNP-68, Scl70, Jo1, CENP-B): il sistema, completamente automatico, si basa sulla tecnologia proteomica multiplex delle microsfere indirizzate. Il numero totale delle determinazioni autoanticorpali è stato di 7.358, eseguite in un tempo totale di circa 4 ore. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando le tecniche analitiche convenzionali di immunofluorescenza indiretta (IFI) ed immunoenzimatiche (ELISA), in uso nella pratica clinica dei Laboratori coinvolti.

Risultati: Mediante curva ROC sono stati definiti i valori soglia dei singoli autoanticorpi, risultati simili a quelli proposti dal produttore. La specificità diagnostica del metodo, valutata sul gruppo di controllo, è risultata oscillare tra 98.6% (dsDNA) e 100% (cromatina, RNP-68, proteina P ribosomiale e CENP-B). La sensibilità diagnostica valutata sui pazienti affetti da malattie reumatiche era compresa tra 14% (SSB) e 60% (cromatina) per il LES, tra 14% (SSB) e 69% (CENP-B) per SSc e tra 61% (SSB) e 89% (SSA-60) per SS, in linea con i dati di letteratura. La concordanza dei risultati è risultata pari all'85% (k=0.66) con il metodo convenzionale ANA-IFI e del 96% (k=0.91) con i metodi ENA-ELISA convenzionali.

Discussione e conclusioni: Il dosaggio degli autoanticorpi nucleo-citoplasmatici con il sistema analitico BioPlex 2200 associa elevata capacità analitica ed alta accuratezza diagnostica, in grado di soddisfare nuove esigenze organizzative all'interno di Laboratori specializzati.

POINT OF CARE TESTING: VALUTAZIONE DI DUE CONTAGLOBULI**G-17****S. Dazzi, M.R. Gorza, S. Deimichei, B. Bardino, L.G. Menghini, D. Tava, P. Caciagli**

U.O. Patologia Clinica – Ospedale S. Chiara Trento

Scopo del lavoro: Valutare due contaglobuli allo scopo di scegliere uno di essi da inserire nel punto di primo intervento di un presidio ospedaliero composto da una medicina generale e due day hospital (chirurgico e cardiologia riabilitativa). Il laboratorio di Patologia Clinica opera in un Ospedale certificato con gli standard Joint Commission International (JCI) i quali prevedono che esami fatti al di fuori del laboratorio siano sotto controllo dello stesso (standard JC AOP 5.3 e AOP 5.9).

Materiali e metodi: Sono stati comparati i valori di 70 emocromi con valori normali o patologici per i seguenti parametri: WBC, RBC, HB, PLT e MCV, raccolti in giorni diversi per due settimane presso il nostro centro prelievi e testati prima sul sistema ADVIA120 (Siemens) e quindi sui due diversi apparecchi ACT DIFF2 Coulter (Instrumentation Laboratory) ed ABACUS junior 5 (A. De Mori).

Risultati: La correlazione tra strumento di routine per i parametri WBC e RBC è migliore per ACT DIFF2 (WBC $r=0,998$ e RBC $r=0,987$) mentre per HB, PLT e MCV la correlazione di ABACUS junior 5 si attesta rispettivamente su $r=0,992$, $r=0,992$ e $r=0,970$ rilevando una prestazione migliore dello strumento Coulter. Tuttavia per entrambi i sistemi testati lo scarto di accuratezza rispetto alla tecnologia di riferimento si rivela minimo. L'ABACUS junior 5 nell'uso risulta più semplice sia a livello di software che di manutenzione.

Conclusioni: Dai dati ottenuti entrambi gli strumenti correlano con lo strumento di routine ritenuto di riferimento. In particolare lo strumento ABACUS junior 5 si è dimostrato semplice e comprensibile ai non addetti. Questi dati preliminari indicherebbero la validità dei due contaglobuli, di essere inseriti in un punto di primo intervento. Da parte del personale del laboratorio come per ogni strumento POCT occorre un vigilante controllo del mantenimento dell'allineamento con gli strumenti della routine così da garantire l'affidabilità dei risultati.

VALUTAZIONE ANALITICA E CLINICA DI TESTS ANA ED ENA SCREENING IN CHEMILUMINESCENZA**G-18****D. Bassetti, C. Nuzzo, A. Zappaterra, P. Lanzafame**

Microbiologia e Virologia, Struttura Semplice Sierologia Autoimmunità, Ospedale S. Chiara di Trento

Scopo del lavoro: Nuove esigenze pratico-gestionali hanno motivato uno studio di valutazione analitica e clinica dei kits LIAISON ANA ed ENA Screen DiaSorin, basati su tecnologia automatizzata di chemiluminescenza (CLIA), mediante confronto con le tecniche convenzionali di Immunofluorescenza (IFI) ed ELISA in uso nel Laboratorio di Autoimmunologia.

Materiali e Metodi: Sono stati studiati 561 soggetti distinti in 295 pazienti con patologia autoimmune non definita o in corso di accertamento, 83 pazienti affetti da malattie reumatiche autoimmuni (LES, SSc, SS, PM), 24 con altra patologia autoimmune (AR, vasculite, PBC, celiachia, epatite autoimmune) e 159 individui di controllo (90 donatrici, 30 donatori di sangue e 39 affetti da malattie infettive). In tutti i campioni è stata eseguita la ricerca di ANA ed ENA con le tecniche IFI ed ELISA (HEp-2 ANA Kit, ENA 6 INOVA forniti da Menarini) automatizzate su strumentazione Zenit-SP+ e con CLIA-LIAISON basata sull'uso di particelle paramagnetiche sensibilizzate con antigeni nativi purificati (SSA, RNP/Sm), ricombinanti (SSB, Jo1, Scl70, CENP-B, mitocondri), dsDNA sintetico, estratto nucleare di HEp2 per ANA screen, antigeni nativi purificati e ricombinanti (SSA, RNP/Sm, SSB, Jo1, Scl70, CENP-B) per ENA screen e di tracciante monoclonale coniugato con isoluminolo. Nella valutazione qualitativa ENA è stato utilizzato per l'autoanticorpo CENP-B, in base al pattern fluoroscopico, il kit Euroline ANA-Profile 3 Euroimmun. I risultati analitici sono stati confrontati mediante la definizione di k di Cohen ed utilizzati, in presenza di diagnosi clinica certa, per la definizione di sensibilità e specificità dei kits valutati.

Risultati: I risultati sono stati definiti utilizzando il cut-off proposto dal produttore, rispettivamente 1,5 ed 1,0 per ANA ed ENA screen. Si è evidenziata una concordanza analitica (agreement) fra i metodi considerati dell'84% per ANA IFI e CLIA con $k=0,58$ e del 90% per ENA ELISA e CLIA con $k=0,80$. I campioni discordanti erano prevalentemente riferibili a pattern fluoroscopici nucleolari, a pazienti affetti da AR o da LES in trattamento farmacologico. La specificità diagnostica del test ANA Screen LIAISON, valutata sul gruppo di controllo, è risultata pari al 96%, mentre la sensibilità diagnostica, calcolata sui pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche, è risultata del 78%.

Discussione e Conclusioni: I risultati ottenuti confermano i dati di concordanza analitica precedentemente evidenziati e prospettano per il test ENA screen LIAISON un'utile collocazione in sistemi di automazione integrata per una più agevole gestione dei campioni, auspicando a tal riguardo un ampliamento del pannello analitico per l'individuazione delle singole specificità autoanticorpali.

DOSAGGIO DELLA VITAMINA D 25OH IN CHEMILUMINESCENZA SU PIATTAFORMA IDS ISYS. VALIDAZIONE DEL METODO E COMPARAZIONE TRA 4 SISTEMI DIAGNOSTICI

G-19

E. Tonutti, P. Molinaro, N. Blasone, E. Grimaldi, L. Meroi, M. Fabris, D. Visentini

Laboratorio di Immunopatologia e Allergologia. Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine

Scopo del lavoro. Il dosaggio della vitamina D 25OH è il metodo di elezione per valutare la biodisponibilità di vitamina D e metaboliti. Il ruolo biologico della vitamina D sembra andare ben oltre la regolazione della omeostasi fosfo/calcaica; la concentrazione di vitamina D riveste infatti un ruolo centrale nel controllo dei meccanismi immunologici. Scopo del nostro lavoro è la valutazione di un nuovo metodo di dosaggio della vitamina D 25OH in chemiluminescenza su piattaforma completamente automatizzata IDS ISYS

Materiali e metodi. 136 sieri consecutivamente pervenuti al Laboratorio della Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine con richiesta di dosaggio della vitamina D 25OH sono stati utilizzati per lo studio. Su ciascun siero sono stati eseguiti 4 dosaggi di vitamina D 25 OH con i seguenti metodi: test IDS competitivo in chemiluminescenza (CLIA) su strumento IDS ISYS (Technogenetics), test competitivo in chemiluminescenza (CLIA) su strumento LIASON (DiaSorin), test immunoenzimatico competitivo in micropiastra (Immunodiagnostic Systems Ltd), test RIA competitivo con vitamina 25 OH marcata con 125I (Immunodiagnostic Systems Ltd). È stata eseguita la correlazione (coefficiente di correlazione di Pearson $R = r^2$) tra il metodo CLIA IDS ISYS e gli altri tre metodi; i risultati espressi in nmol/L ottenuti con ciascun metodo sono stati inoltre classificati secondo i 4 intervalli di concentrazione della vitamina D 25OH suggeriti dalla letteratura (0-25 = carenza, 25-75 = insufficienza, 75-250 = sufficienza, >250 = tossicità); è stata eseguita la comparazione tra il metodo IDS ISYS e gli altri 3 metodi utilizzando i risultati espressi come % di concordanza per le classi di intervallo.

Risultati. I coefficienti di correlazione espressi in nmol/L tra IDS ISYS e Liason, IDS ISYS e immunoenzimatica e IDS ISYS e RIA erano rispettivamente di $R = 0.89$, $R = 0.84$ e $R = 0.89$. La correlazione in tutti e tre i casi risulta molto buona ($p < 0.001$). Le percentuali di correlazione tra i metodi valutando la concordanza per le 4 classi di intervallo erano: 63% tra IDS ISYS e Liason, 69% tra IDS ISYS e immunoenzimatica e 67% tra IDS ISYS e RIA.

Discussione e conclusioni. Lo strumento IDS ISYS walk away ad accesso random è un processore rapido, affidabile ed efficiente per la determinazione della vitamina D25OH. Il nostro studio ha dimostrato che sono necessari standard di riferimento internazionali per una migliore correlazione dei metodi in uso.

REVISIONE DEL PROCESSO TECNICO-ORGANIZZATIVO DELL'ESAME URINE CON IL NUOVO CITOFLUORIMETRO uf-1000i

G-20

E. Manoni, M. Ercolin, I. Bountis, L. Avogaro, T. Zorzan, D. Cioetto

Regione Veneto-ULSS 17 Este UOC Integrata di Medicina di Laboratorio

Scopo del Lavoro: Lo studio della frazione corpuscolata delle urine con citofluorimetri di 3° generazione migliora la precisione e l'accuratezza cambiando il processo analitico e di conseguenza il ricorso a revisione dei grafici ed all'osservazione microscopica; inoltre variano i valori di riferimento e la conseguente l'interpretazione dei dati. Pertanto oltre a predisporre un algoritmo razionale nella sequenza analitica del processo, si è ritenuto opportuno commentare, attraverso codifica, tutti i risultati rilevanti sulla base di griglie predefinite. Abbiamo valutato l'impatto del nuovo strumento sul processo analitico routinario in termini di revisione dei grafici, ricorso all'osservazione microscopica e numero di referti commentati sul totale dei campioni esaminati.

Materiali e metodi: L'UF-1000i utilizza un nuovo laser, nuovi fluorocromi polimetinici, un nuovo canale per i batteri ed un nuovo banco ottico per rilevare la diffusione laterale della luce. I risultati differiscono dall'UF-100 migliorando notevolmente le performances. Sono stati processati 1271 campioni consecutivi ed è stato valutato il numero di campioni validati senza ulteriori indagini, quelli validati dopo revisione dei grafici e quelli dopo osservazione microscopica. Si sono adottate nuove soglie che permettessero in automazione commenti in chiave clinica sui risultati ottenuti raffrontati a soglie di allerta e di quelle di norma in uso: valori nell'ambito di riferimento = commento nulla di patologico; valori patologici/flags = valutazione grafici/osservazione microscopica = validazione e commento sul/i parametro/i patologici.

Risultati. Su 1271 campioni, 764 (60,11%) erano all'interno della griglia rilascio automatico a LIS, 507 hanno richiesto la verifica dei grafici, che ha consentito la convalida di ulteriori 373 campioni (29,35%), mentre i restanti 134 (10,54%) sono stati verificati al microscopio. Sono stati inseriti nei campioni processati commenti inerenti le caratteristiche di normalità n° 453 (36%) e marcata positività n° 259 (20%) per un totale di n. 713 (56%) referti commentati.

Discussione e conclusione. Il recente inserimento dei nuovi citofluorimetri UF 1000i ha dimostrato di poter garantire: miglioramento della precisione, quantificazione più affidabile, affinamento degli intervalli di riferimento, aumento della produttività anche in relazione alle possibilità offerte dal software DMS. Questo non deve far trascurare come il ricorso alla microscopia ed all'esperienza degli operatori siano elementi fondanti la corretta valutazione analitica e l'espressione in chiave clinica dei risultati.

VALUTAZIONE CONOSCITIVA DEI DOSAGGI ACCESS® E DELLA PIATTAFORMA UNICEL DXI 800

G-21

N. Colanero, C. Crognale, G. Ciancaglini, M. Marino, I. Corti, L. Gargiulo, F. Di Luca, F. Febbo, F. Indino, P. Pasquini, M. Golato

Patologia Clinica, OC Lanciano

Introduzione. Il nostro laboratorio è suddiviso in un settore dedicato alle analisi urgenti e di routine per chimica clinica e marcatori cardiaci (830.000/aa), ed in uno specializzato per la routine di immunometria (105.706/aa).

Scopo. Valutare sulla piattaforma analitica ad alta produttività UniCel DxI800 Beckman Coulter i parametri TSH, FT4, PSA totale, GICA (CA19.9) e BR (CA15.3) rispetto ai dosaggi su AIA21 Tosoh e verificare il possibile inserimento della stessa nell'organizzazione del nostro laboratorio, soggetta a scadenza per le gare e a riduzione del personale per mancata sostituzione dei pensionamenti.

Materiali e metodi. Confronto metodi su campioni di siero selezionati dalla routine per 2 mesi con Software MedCalc: Passing&Bablok (PB), Bland&Altman (BA, differenze %), coefficiente di correlazione r. Concordanza clinica rispetto ai cut-off per GICA e BR (35 UI/mL DxI vs 36.7 AIA e 31.3 vs 37). Verifica dei livelli prestazionali come imprecisione globale su materiali di controllo di diversa origine (commerciali a 3 livelli, dedicati forniti dal produttore). Valutazione analizzatore per: creazione di un'aliquota ad uso interno con conseguente restituzione immediata del tubo primario; capacità di gestire contemporaneamente 50 differenti reagenti; accesso in continuo per carico e scarico di campioni, calibratori, controlli, reagenti e consumabili; elevata cadenza analitica dichiarata.

Risultati. Si riportano i più significativi.

TSH (n=47): PB $y=0.03212+0.7542x$; BA media 30.4998, SD 24.7032, limite inf. -17.9185 e sup. 78.9180; $r=0.9922$ $P<0.0001$.

FT4 (n=36): PB $y=0.02312+0.8555x$; BA media 10.713, SD 14.8915, limite inf. -19.1161 e sup. 39.2588; $r=0.9913$ $P<0.0001$.

PSA totale (n=23): PB $y=0.0840+0.9800x$; BA media -2.8967, SD 11.2504, limite inf. -24.9475 e sup. 19.1541; $r=0.9983$ $P<0.0001$.

GICA (n=30): PB $y=2.5881+1.5306x$; BA media -43.2903, SD 70.9119, limite inf. -182.2776 e sup. 95.6969; $r=0.8741$ $P<0.0001$.

Concordanza clinica 86%. BR (n=21): PB $y=1.8314+0.5266x$; BA media 34.8573, SD 41.3387, limite inf. -46.1666 e sup. 115.8811;

$r=0.7951$ $P<0.0001$. Concordanza clinica 86%. L'imprecisione è sempre risultata inferiore alle dichiarazioni del produttore.

Tutte le caratteristiche tecniche dell'analizzatore sono state confermate.

Discussione e conclusioni. Il confronto tra le metodiche in uso nel nostro laboratorio e quelle Access ha dato risultati soddisfacenti. Per GICA e BR è stato fondamentale valutare il confronto con la clinica, ulteriormente approfondito rispetto alla semplice analisi rispetto ai cut-off. UniCel DxI800 ha risposto alle aspettative per quanto riguarda le caratteristiche tecniche di affidabilità, velocità, semplicità di utilizzo e reale walk-away, dimostrandosi all'altezza di un consolidamento anche spinto.

COMPARABILITA' DELLE MISURE DI RDW IN 5 ANALIZZATORI EMATOLOGICI

G-22

C. Feruglio, B. Biasioli, P. Bulian, M. Buttarello, B. Casolari, A. Cenci, G. Da Rin, P. Doretto, V. Miconi, L. Pasini, C. Piccinini, E. Piva, P. Cappelletti

Gruppo di studio in Ematologia della SIMeL (GdSE)

Scopo del lavoro: Confrontare la misura di RDW fornita da 5 analizzatori ematologici per determinare intervalli di riferimento, livelli di imprecisione, comparabilità tra metodi.

Materiali e Metodi: RDW è stato misurato su 345 soggetti, di cui 139 normali e 206 patologici. I campioni sono stati prelevati in EDTA ed analizzati entro 6 ore su ADVIA 120, CD 4000, LH-750, PENTRA, XE-2100. L'intervallo di riferimento comprende i valori dal minimo al 95.mo percentile superiore dei soggetti normali (intervallo ad una coda, i valori minimi sono stati considerati non patologici). L'imprecisione è stata determinata su duplicati secondo protocollo CLSI H-20A2. La comparabilità è stata valutata analizzando grafici delle differenze rispetto alla media per consenso.

Risultati: Il limite (superiore) dell'intervallo di riferimento di RDW è variabile e strumento dipendente, oscillando da un minimo di 13.0 (CD4000) ad un massimo di 17.3 (PENTRA), più allineati risultano ADVIA 120 (14.2), LH-750 (14.6) e XE-2100 (14.3). L'imprecisione è sempre inferiore ad 1%, variando da 0.03% di ADVIA 120 a 1.01% di PENTRA. Le differenze attese (come intervallo di confidenza del 95%) dalla media di consenso sono minime per XE-2100 (da -1% a +1%), mentre negli altri strumenti complessivamente vanno da da -2% a +4%.

Discussione e Conclusioni: Questo studio mette in evidenza importanti differenze nella misura di RDW, solo in parte spiegate da differenze nella tecnologia di misura; inoltre le differenze riscontrate per RDW sono diverse da quelle rilevabili misurando MCV sugli stessi campioni. Nonostante nel passato ne sia stato a più riprese proposto l'uso nella diagnosi differenziale delle anemie (soprattutto talassemie rispetto ad anemie ferroprive ed anemie da malattia cronica) e recentemente come predittore indipendente di mortalità generale, RDW non sembra ancora possedere caratteristiche analitiche tali da consentirne l'inserimento nel referto, al pari dei tradizionali componenti dell'esame emocromocitometrico. Ciò è avvalorato dall'eterogeneità degli intervalli di riferimento, che preclude la trasferibilità di qualsiasi soglia decisionale e/o diagnostica e dall'entità delle differenze dalla media di consenso, che superano ampiamente i valori associati ad un incremento di rischio di mortalità (aumento del rischio di morte del 23% per 1% di incremento di RDW). E' raccomandabile che futuri studi su RDW vengano progettati assicurando la misura sulla stessa tecnologia e possibilmente sullo stesso modello di analizzatore ematologico, e che la trasferibilità dei risultati a determinazioni eseguite con altre tecnologie non venga affermata a priori.

UNA PRIMA ESPERIENZA SUI TEST DI SCREENING PER DETERMINARE L'ASSENZA DI SOSTANZE STUPEFACENTI E/O PSICOTROPE IN LAVORATORI ADDETTI A MANSIONI A RISCHIO**G-23****L. Camogliano, G. Ferorelli**

Laboratorio Analisi P.O. di Novi Ligure (ASLAL)

Introduzione. L'accordo Stato-Regioni, ottobre 2008, recepito in Regione Piemonte con DGR 13-10928 del 10.03.09, ha normato in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza in lavoratori addetti a mansioni a rischio. Presso il Laboratorio Analisi di Novi Ligure, ASLAL, abbiamo iniziato tale attività, eseguendo i prescritti test di screening, ed inviando presso il Laboratorio di Tossicologia dell'ASO di Alessandria i campioni B risultati positivi, per i relativi test di conferma. Nel periodo gennaio-giugno 2009 sono stati sottoposti ad esami 1492 lavoratori. In tutti sono stati ricercate le seguenti sostanze: THC, Cocaina, Oppiacei, Metadone, MDMA, amfetamine /metamfetamine. In una parte di essi, non considerata in questo studio, anche Buprenorfina e Benzodiazepine.

Materiali e Metodi. I test sono stati eseguiti su "Power System" Beckman-Coulter, con reagenti forniti dalla ditta. Per tutte le sostanze il cut-off utilizzato corrispondeva a quello stabilito dalla normativa, tranne che per le Amfetamine per le quali il cut-off del metodo era di 1000 ng/ml, mentre quello raccomandato era di 500 ng/ml. Il problema è stato risolto implementando sul sistema una metodica semiquantitativa, e rispettando il cut-off raccomandato. Modulistica e procedure adottate erano conformi al dettato legislativo.

Risultati. I lavoratori risultati positivi ad almeno un test sono stati 23 (1,54%), alcuni a più di un test, per un totale di 27 test positivi (1,80%). I test di conferma non hanno confermato 4 risultati, portando il totale dei lavoratori positivi a 20 (1,34%) e il totale dei test positivi a 23 (1,54%). I positivi confermati erano così distribuiti: THC 13 (0,87), Metadone 1 (0,06), Oppiacei 4 (0,27) Coca 5 (0,33). I positivi non confermati erano 2 THC per interferenza da Morniflumato, e 2 Oppiacei (1 per presenza di Codeina e 1 senza interferenze accertate ma con >25000 ng/ml di metadone). I dati sono stati poi stratificati per età dei lavoratori.

Conclusioni. Lo studio ha confermato altri dati provvisori ottenuti in Veneto ed Emilia-Romagna ed ha confermato l'interferenza che il Morniflumato esercita sulla determinazione del THC con la metodica in uso, dato già presente in letteratura. Inattesa è stata invece la non conferma di un test risultato positivo per gli oppiacei, verosimilmente dovuta alla grande quantità di metadone rilevata sullo stesso campione (>25000 ng/ml). Un dato interessante si è ricavato dalla stratificazione per età dei soggetti che ha dimostrato come la metà circa dei consumatori di THC abbia meno di 30 anni, la quasi totalità dei positivi agli oppiacei abbia più di 30 anni (solo uno ne ha 29), mentre i consumatori di coca si distribuiscono pressoché uniformemente fra tutte le età.