

UTILITÀ DELL'ALLARME RBCG (OMBRE ERITROCITARIE) IN PRESENZA DI DEGRANULAZIONE PIASTRINICA EDTA DIPENDENTE

A-01

D. Tanca, G. Devoto, L. Brillante, C. Marchello

Laboratorio Analisi ASL 4 Chiavarese Ospedale Lavagna (GE)

Scopo del lavoro. Valutazione dell'allarme RBCG e piastrinopenia.

Materiali e Metodi. ADVIA 120; M.O.:Olympus; strisci periferici colorati con May-Grunwald-Giemsa.

Risultati. Paziente di 20 anni ,sesso femminile, che si presenta con un quadro clinico asintomatico ed una piastrinopenia lieve (115.000). Emocromo processato alcune ore dopo il prelievo. Scattava l'allarme RBCG, ma non quello di piastrine aggregate. L'esame microscopico dello striscio periferico evidenziava la presenza di piastrine prive di granuli, numericamente normali; assenti aggregati piastrinici (Foto e citogrammi). Abbiamo provveduto a richiamare la pz eseguendo il prelievo in EDTA e Sodio Citrato. Al tempo Zero (entro dieci minuti dal prelievo)registravamo un numero di piastrine normali su entrambi i campioni (238.000), con allarmi NRBC e PLT CLM. L'esame microscopico dello striscio periferico evidenziava piastrine morfologicamente normali e normogranulari (Foto e citogrammi).

Discussione e conclusioni. È indispensabile, in presenza di allarme RBCG, un'attenta valutazione dei grafici di distribuzione della popolazione piastrinica, comparando sempre il dato numerico dell'analizzatore con quello derivato dall'esame microscopico dello striscio periferico, onde non incorrere in gravi errori clinici.

ATTIVAZIONE DELL'ALLARME NRBC (ERITROBLASTI) IN UN CASO DI SINDROME DI BERNARD SOULIER

A-02

D. Tanca, G. Devoto, L. Brillante, C. Marchello

Laboratorio Analisi ASL 4 Chiavarese, Ospedale Lavagna (GE)

Scopo del lavoro. Valutazione dell'allarme NRBC e piastrinopenia.

Materiali e Metodi. ADVIA 120; M.O.: Olympus; strisci periferici colorati con May-Grunwald-Giemsa.

Risultati. Paziente di anni 18, sesso femminile, che esegue accertamenti di routine. L'esame emocromocitometrico evidenzia una grave piastrinopenia (20.000). Il campione caratterizza l'allarme NRBC. L'esame microscopico dello striscio periferico evidenzia la presenza di piastrine "giganti" delle dimensioni di un globulo rosso e di un piccolo linfocita (maggiori di 60 fL) (Foto e citogrammi). Abbiamo provveduto a richiamare la pz, ripetendo il prelievo in EDTA e Sodio Citrato. L'anamnesi era positiva, anche nella madre, per Sindrome di Bernard Soulier. Anche sui nuovi prelievi abbiamo registrato l'allarme NRBC e la grave piastrinopenia, che non era confermata al conteggio microscopico in camera di Burker (150.000).

Discussione e Conclusioni. È indispensabile, di fronte all'attivazione dell'allarme NRBC in abbinamento a piastrinopenia, un'attenta valutazione dei grafici di distribuzione della popolazione piastrinica, comparando sempre il dato numerico dell'analizzatore con quello derivato dall'esame microscopico dello striscio periferico e dal conteggio in camera di Burker, onde non incorrere in gravi errori clinici.

IL PROFILO PIASTRINICO AUTOMATIZZATO NEL PAZIENTE CON INSUFFICIENZA RENALE CRONICA

A-03

A. Giacomini, M. Urso, L. Beghi, F. Antico, S. Valverde, G. Munaretto, G. Gessoni

Dip. di Patologia Clinica, Serv. di Nefrologia, Osp. di Chioggia; Dip. di Matematica Pura e Applicata, Univ. di Padova

Scopo del lavoro. Questo studio si propone di valutare lo stato di attivazione piastrinica in pazienti affetti da insufficienza renale cronica (IRC) in emodialisi grazie alla possibilità di determinare, contestualmente all'emocromo, alcuni parametri piastrinici di recente introduzione per mezzo dell'analizzatore ematologico ADVIA 120.

Materiali e metodi. Sono stati inclusi nello studio 37 pazienti (20 maschi e 17 femmine, età media: 65 anni, tempo medio di dialisi: 59 mesi), alcuni dei quali (n=11) erano in trattamento con farmaci antiaggreganti. I campioni di sangue sono stati prelevati immediatamente prima della dialisi. I pazienti sono stati confrontati con un gruppo di soggetti di riferimento (n=53), appaiato per età e sesso. Il sangue è stato raccolto in provette Vacutainer contenenti K2EDTA (Terumo Europe N.V. 3001 Leuven, Belgio), conservate a temperatura ambiente e analizzate con ADVIA 120 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY) fra 30' e 90' dopo il prelievo. Sono stati valutati i seguenti parametri piastrinici: PLT (conta piastrinica), MPV e PDW (media e ampiezza di distribuzione del volume piastrinico), MPC e PCDW (media e ampiezza di distribuzione della densità piastrinica). I dati sono poi stati analizzati mediante modelli di ANOVA.

Risultati. Dal confronto dei pazienti con i soggetti di riferimento non sono emerse differenze significative per quanto riguarda PLT, MPV, PDW, mentre MPC è risultato significativamente più basso (maschi: $p < 0.01$, femmine: $p < 0.01$) e PCDW significativamente più alto (maschi: $p < 0.05$ femmine: $p < 0.01$) nei pazienti rispetto ai soggetti di riferimento.

Discussione e Conclusioni. Il fenomeno dell'attivazione piastrinica nel paziente IRC in emodialisi, che è stato prevalentemente studiato con la citofluorimetria, può ora essere monitorato in vivo grazie al metodo ottico bidimensionale di analisi delle piastrine applicato da ADVIA 120. Questo metodo fornisce i nuovi parametri piastrinici MPC e PCDW, che misurano rispettivamente la densità media piastrinica e il suo grado di dispersione. L'MPC è un indice di attivazione piastrinica che rappresenta, grazie alla maggiore praticabilità, una interessante alternativa alla citofluorimetria nel Laboratorio Clinico. La densità piastrinica, misurata come MPC, si è dimostrata utile, nella nostra esperienza, per valutare l'attivazione piastrinica in vivo. È comunque necessario il monitoraggio dei pazienti con IRC in emodialisi, al fine di stabilire una correlazione fra le modificazioni di MPC e PCDW e il rischio cardiovascolare in questa patologia e al fine di valutare l'efficacia delle terapie antiaggreganti sempre più diffusamente somministrate a questi soggetti.

VALUTAZIONE DELLE PROTEINE BAX E BCL2 MEDIANTE CITOFUORIMETRIA A FLUSSO IN PATOLOGIE LINFOPROLIFERATIVE ALL'ESORDIO

A-04

M. Maconi*, L. Albertazzi*, F. Scamardella*, B. Gamberi, M. Brini***

*U.O.Laboratorio Analisi Chimico Cliniche; ** U.O.Ematologia; Arcispedale S.Maria Nuova, Reggio Emilia

La Leucemia Linfatica Cronica (LLC) e alcuni tipi di Linfomi sono caratterizzati soprattutto da un difetto dei processi apoptotici. Recenti studi effettuati su neoplasie ematologiche e non, hanno evidenziato come i livelli intracellulari di queste due molecole, riflettendo lo stato apoptotico della cellula neoplastica, abbiano un valore prognostico per l'inquadramento clinico e il successivo outcome del paziente. Sembra infatti che un fenotipo scarsamente apoptotico della cellula neoplastica sia indice di prognosi più infausta, indipendentemente dalla sede e dalla noxa cancerogena.

Scopo del lavoro. Valutazione dello stato apoptotico delle cellule CD19+ e CD3+ in LLC e alcuni LNH.

Materiali e metodi. Sono stati esaminati 34 pazienti con: LLC (21), LFO (9) e altri LNH (4) all'esordio e 11 donatori di sangue. Veniva valutata mediante citofluorimetria (XLCoulter) l'intensità media di fluorescenza (MIF) della proteina pro-apoptotica Bax e anti-apoptotica Bcl2 nelle cellule CD19+ e CD3+. Sono stati utilizzati gli MoAb anti-Bax (Oncogene) e anti-Bcl2 (Dako). L'analisi statistica è stata eseguita confrontando i dati ottenuti dai donatori con quelli dei soggetti patologici utilizzando il t-Student.

Risultati. I risultati ottenuti sono mostrati come MIF. La popolazione dei donatori mostrava un MIF di: Bax CD19+ di 29.2, Bcl2 CD19+ di 8.1; Bax CD3+ di 87.7; e Bcl2 CD3+ di 9.2. Nella popolazione dei pazienti con LLC si otteneva un MIF di: Bax CD19+ di 19.7**, Bcl2 CD19+ di 13.5*, Bax CD3+ di 76.4, Bcl2 CD3+ di 10.2. Nei pazienti con LFO si aveva un MIF di: Bax CD19+ di 16.6**, Bcl2 CD19+ di 11.2, Bax CD3+ di 55.87**, Bcl2 CD3+ di 23.7. Nei pazienti con altri LNH si otteneva un MIF di: Bax CD19+ di 20**, Bcl2 CD19+ di 9.8, Bax CD3+ di 79.2, Bcl2 CD3+ di 10. * $p < .05$, ** $p < .001$

Discussione e conclusioni. I dati ottenuti indicano un ridotto stato apoptotico delle cellule B in tutte le patologie indagate. Inoltre mentre nelle LLC e negli altri LNH, le cellule CD3+ non mostrano livelli apoptotici diversi statisticamente significativi rispetto ai controlli, nei LFO il livello di Bax è notevolmente ridotto ($p < .001$). Pertanto mentre nelle LLC e in altri LNH solo le cellule CD19+ sono bloccate nel loro stato apoptotico, nei LFO anche le CD3+ sembrano subire tale processo.

**ESPRESSIONE DI ZAP-70 IN LINFOMI NON HODGKIN (LNH)
VALUTATA IN CITOFUORIMETRIA**

A-05

M. Brini*, F. Scamardella*, M. Maconi*, L. Albertazzi*, F. Ilariucci**

*U.O.Laboratorio Analisi Chimico Cliniche-Dipartimento Patologia Clinica;

** U.O. Ematologia-Dipartimento Onco-Ematologia Arcispedale S.Maria Nuova, Reggio Emilia

La Leucemia Linfatica Cronica (LLC-B) può essere classificata in 1 o 2 maggiori sottogruppi in base all'espressione dei geni che codificano per la regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgVH): pazienti che esprimono mutazioni somatiche per i geni IgVH. presentano un decorso relativamente meno aggressivo rispetto a quelli che ne sono privi. Recenti studi hanno dimostrato che l'espressione della protein kinasi ZAP-70, nelle cellule CD19+ di LLC-B, sebbene senza alcuna chiara ragione, è inversamente correlata con il riarrangiamento genico IgVH-correlato; pazienti che presentano un fenotipo CD19+/ZAP70+ mostrano un decorso della malattia più aggressivo rispetto a coloro che mostrano un fenotipo CD19+/ZAP-70-. Per quanto riguarda gli altri LNH indolenti (L.Follicolari (LFO), L.Marginali (LMAR), L.Mantellari (LMAN)) a tutt'oggi non esistono dati sperimentali che correlino l'espressione della ZAP-70 col decorso della malattia.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'espressione della ZAP-70 nelle LLC-B e in altri LNH mediante analisi citofluorimetrica.

Materiali e metodi: è stata analizzata, mediante citometria a flusso, l'espressione della ZAP-70 nelle cellule CD19+ (Dako) di campioni di sangue periferico di 20 pazienti affetti da LLC, 7 LFO, 2 LMARG, 3 LMANT all'esordio di malattia. Le cellule sono state pretrattate con Fix & Perm kit (Dako) e cimentate con MoAb anti ZAP-70 (Alexa fluor-Caltag Laboratories).

Risultati: Hanno mostrato un fenotipo CD19+/ZAP-70 + : 4/20 pazienti LLC, 2/3 pazienti LMANT, 0/1 LMARG, 0/7 LFO.

Discussione e conclusioni: La casistica da noi studiata per la valutazione dell'espressione della ZAP-70 mediante l'analisi citofluorimetrica ci ha permesso di sostituire l'analisi molecolare in maniera maggiormente efficace, rapida e meno dispendiosa rispetto alla analisi della ipervariabilità dei geni IgVH e i dati ottenuti risultano in linea con la letteratura finora pubblicata.

**CONFRONTO DEI VALORI DELLE PROTEINE INTRACELLULARI BAX
E BCL2 NEL SANGUE MIDOLLARE (SM) E PERIFERICO (SP) DI PAZIENTI
CON LEUCEMIA LINFATICA CRONICA (LLC) E LINFOMI NON HODGKIN (LNH)**

A-06

M. Brini*, L. Albertazzi*, F. Scamardella*, M. Maconi*, F. Merli**

*U.O.Laboratorio Analisi Chimico Cliniche; ** U.O. Ematologia Arcispedale, S.Maria Nuova, Reggio Emilia

L'evento iniziale alla base dell'insorgenza della LLC e di alcuni di LNH è causato più che da un aumento della proliferazione clonale, da un diminuito tasso di morte cellulare per un difetto dei processi apoptotici che provoca un accumulo dei linfociti nel sangue circolante.

Il rapporto delle concentrazioni intracellulari di Bax/Bcl2 riflette lo stato apoptotico della cellula; sembra infatti che uno fenotipo scarsamente apoptotico della cellula neoplastica sia indice di prognosi più infausta, indipendentemente dalla sede e dalla noxa che ha dato origine al processo cancerogeno.

Scopo del lavoro: confrontare l'espressione delle proteine Bax e Bcl2 nelle popolazioni CD19+ e CD3+ in campioni di SM e SP di pazienti con LLC e LNH per verificare se vi siano delle differenze tra i livelli apoptotici all'interno del microambiente midollare e periferico.

Materiali e metodi: campioni di cellule CD19+ e CD3+ provenienti da SP e SM di 7 pazienti (6 LLC, 1 LFO) all'esordio di malattia e di 11 soggetti donatori sangue (solo campioni di SP) sono state incubate con Moab rispettivamente anti-Bax (Onco-gene) e anti-Bcl2 (Dako). I valori medi di intensità di fluorescenza (MIF) ottenuti mediante analisi citofluorimetrica (XLCoulter) correlavano con l'espressione intracitoplasmatica delle proteine Bax e Bcl2. I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante t di Student.

Risultati: per ogni campione sono stati valutati il MIFBax il MIFBcl singolarmente, sia la ratio ottenuta dal rapporto dei 2 MIF. I dati ottenuti indicano che non esistono diversità dei livelli apoptotici tra il microambiente midollare e quello periferico sia per quanto riguarda la popolazione CD19+ che la popolazione CD3+ rispetto ai valori ottenuti nei controlli. Si è inoltre riscontrato che i livelli della proteina Bax (sia nel SM che nel SP), e quindi un maggior stato apoptotico, sono, sia nei campioni patologici che nei controlli, più elevati nelle cellule CD3+ (psp < 0.001, psm < 0.001) rispetto alle cellule CD19+. Tuttavia nei campioni patologici la MIFBax (sia nel SP che SM) dimostra una maggior dispersione rispetto ai controlli. Nonostante l'esiguità del numero dei pazienti in esame, non è stata riscontrata alcuna differenza tra le diverse patologie indagate.

Discussione e conclusioni: fermo restando la scarsa numerosità dei campioni, non sono state evidenziate diversità tra lo stato apoptotico dei due microambienti cellulari. Inoltre, nonostante le patologie indagate siano ristrette alle cellule B si è notato un coinvolgimento delle popolazione CD3+ evidenziato dalla maggior dispersione del MIFBax rispetto ai controlli.

PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE C (HCV) NELLE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE DEI LINFOCITI B

A-07

G. Lobreglio, R. Torsello, P. Pensa

Azienda USL LE/1, Presidio Ospedaliero "Vito Fazzi", U.O. Patologia Clinica, Lecce

Scopo del lavoro: Il ruolo di HCV nella linfomagenesi e l'associazione tra l'infezione da HCV e i linfomi B non Hodgkin (BNHL) sono stati a lungo dibattuti, per la mancata evidenza definitiva della presenza del virus nelle cellule maligne, la possibilità di bias positivi o negativi nella selezione dei pazienti e l'ampia variabilità geografica della prevalenza dell'infezione e dei differenti genotipi virali. Questo studio si propone di valutare la prevalenza di infezione di HCV in 63 pazienti consecutivi affetti da vari tipi di BNHL afferenti ad un'unica istituzione (Ospedale Vito Fazzi, Lecce).

Materiali e metodi: Sono stati studiati 63 pazienti consecutivi con nuova diagnosi di linfomi non Hodgkin a cellule B (31 affetti da leucemia linfatica cronica, 22 da linfoma follicolare, 3 da Macroglobulinemia di Waldenström, 4 da linfoma mantellare e 3 da linfoma della zona marginale) e 110 controlli paragonabili per sesso ed età. La diagnosi di BNHL e dei differenti sottotipi è stata formulata in base alla storia clinica, all'esame obiettivo, alle indagini di radioimaging, biotiche ed immunocitofluorimetriche. L'infezione da HCV è stata valutata mediante il dosaggio degli anticorpi anti HCV e dell'HCV-RNA nel siero.

Risultati e discussione: L'infezione da HCV è stata evidenziata in un solo paziente affetto da BNHL (leucemia linfatica cronica in stadio 2) e in un soggetto di controllo. Questo studio, pertanto, non ha dimostrato una più alta prevalenza dell'infezione da HCV nei pazienti affetti da linfoma non Hodgkin a cellule B afferenti alla nostra Istituzione e suggerisce che variazioni geografiche e/o bias nella selezione dei pazienti possono giustificare l'aumento di prevalenza dell'infezione da HCV nei pazienti con BNHL descritta in altri studi (Silvestri et al., Blood 1996, Zuckerman et al., Ann Intern Med 1997).

CONTEGGIO PIASTRINICO IN DUE CAMPIONI CRITICI

A-08

C. Lazzi, F. Sirianni, M. Miatton, B. Della Vedova

Laboratorio Analisi di Palmanova (UD) - ASS 5 "Bassa Friulana"

Scopo del lavoro. Descrizione di due casi di falsa piastrinosi in due campioni riscontrati con il sistema ematologico Bayer ADVIA 120.

Materiali e metodi. Caso A. paziente di 86 anni con cirrosi epatica HCV+ in fase ascitica e m. di Waldenström (IgM = 2300 mg/dL). Caso B. paziente di 58 anni con sindrome nefrosica HCV+ e crioglobulinemia mista (criocrito = 11%). Gli emocromi sono stati testati su Bayer ADVIA 120 e Dasit SE 9000, a T ambiente e a 37 °C ed è stato eseguito lo striscio periferico.

Risultati. Caso A. PLT ($10^3/uL$): su ADVIA 120 = 848 Ta; 362 a 37 °C; presenti flag su PLT ed RBC. PLT ($10^3/uL$) su SE 9000 = 321 a Ta; 224 a 37 °C; assenti flag su PLT ed RBC. Striscio periferico: presenza di rouleaux e di materiale amorfo omogeneo. Non aggregati piastrinici né anisocitosi piastrinica. Il numero delle PLT sembrava correlare con quello dell'SE 9000 a 37 °C. Formula leucocitaria normale. Caso B. PLT ($10^3/uL$): su ADVIA 120 = 1160 a Ta; 370 a 37 °C; presenti flag su RBC. PLT ($10^3/uL$) su SE 9000 = 313 a Ta; presenti flag su PLT e RBC. 218 a 37 °C; presenti flag su RBC. Striscio periferico: presenza di rouleaux e di materiale amorfo finemente granuloso. Non aggregati piastrinici né anisocitosi piastrinica. Anche nel caso B il numero delle PLT sembrava correlare con quello dell' SE 9000 a 37 °C. Formula leucocitaria normale.

Discussione e conclusioni. Gli allarmi degli strumenti ematologici non sono sempre specifici. Nel caso A l' ADVIA 120 ha allarmato PLT ed RBC sovrastimando le PLT, mentre l' SE 9000 non ha prodotto alcun flag. Nel caso B l' ADVIA 120 ha prodotto flag solo su RBC, sovrastimando le PLT, mentre l' SE 9000 ha allarmato solo gli RBC a 37 °C e a Ta ha allarmato RBC e PLT. Ciò deriverebbe dall' interferenza delle paraproteine e delle crioglobuline che interagiscono in diverso modo nei due sistemi ematologici. L'operatore deve valutare con spirito critico gli allarmi strumentali, specie per particolari patologie.

STUDIO DELLE MIELODISPLASIE MEDIANTE IMPIEGO DELLA CITOMETRIA A FLUSSO MULTIPARAMETRICA

A-09

M.M. Ciriello, T. Callegari, L. Calcagno, L. Giargia, C. Arfini

Dipartimento di Patologia Clinica, Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera, Alessandria

Scopo del lavoro. Le mielodisplasie sono disordini clonali della cellula staminale emopoietica caratterizzati da emopoiesi inefficace, citopenie periferiche e aumentato rischio di sviluppare leucemie acute. In questo lavoro abbiamo studiato il profilo immunofenotipico delle cellule midollari di pazienti mielodisplastici, utilizzando l'approccio citometrico multiparametrico.

Non esiste un consenso generale sull'utilità diagnostica dei parametri immunofenotipici, negli ultimi anni è tuttavia aumentato l'interesse per gli studi citofluorimetrici e sono state evidenziate nelle mielodisplasie varie anomalie di espressione di antigeni di superficie relativi sia alla popolazione eritroide, sia soprattutto alla popolazione mieloide. Il nostro obiettivo è quello di avere un approccio multiparametrico citofluorimetrico in grado non solo di fornire dati quantitativi, ma anche qualitativi relativi all'assetto cellulare midollare.

Materiali e Metodi. Il metodo citometrico da noi usato prevede la marcatura dei campioni di sangue midollare con anticorpi monoclonali direttamente coniugati a fluorocromi, la lisi ed una strategia di gating basata su light scatter e CD45 associata a differenti combinazioni di anticorpi monoclonali (immunofluorescenza a tre o quattro colori).

Risultati. Il sangue midollare di 27 pazienti con diagnosi morfologica di mielodisplasia è stato contemporaneamente analizzato in citometria a flusso per evidenziare eventuali anomalie di espressione antigenica delle popolazioni eritroidi mieloidi e monocitarie, mediante confronto di un ampio pannello di anticorpi monoclonali con i patterns riscontrati nei midolli normali, in uno studio precedente. Le anomalie osservate più frequentemente sono le seguenti: ipogranularità delle cellule mieloidi, positività del CD56 sulla linea monocitaria e mieloide, anomalie dei patterns di espressione di CD11b versus CD66b, CD13 versus CD16 e CD33 versus CD16 sulla popolazione mieloide e Glicoforina-A versus CD71 sulla popolazione eritroide.

Discussione e conclusioni. I criteri standard per la diagnosi di mielodisplasia sono basati sulla morfologia e sulla dimostrazione di anomalie citogenetiche clonali. Lo studio citometrico degli aspirati midollari di pazienti con mielodisplasia ha evidenziato anomalie di espressione antigenica nelle popolazioni mieloidi e eritroidi, mentre risulta ancora difficile la valutazione della serie megacarioblastica. La contemporanea presenza di anomalie in due o più linee cellulari sembra essere caratteristica delle mielodisplasie. L'immunofenotipo citometrico risulta più sensibile della morfologia nell'evidenziare anomalie della serie mieloide, ma meno per le serie eritroide e megacariocitaria. Inoltre risulta di valido aiuto in quegli aspirati midollari ipocellulari, nei quali la morfologia non è in grado di supportare una diagnosi certa. Sia l'immunofenotipo che la morfologia risultano più sensibili della citogenetica nella diagnosi di mielodisplasia.

UTILIZZO DI UN SISTEMA GESTIONALE AUTOMATIZZATO NEL LABORATORIO DI EMATOLOGIA

A-10

C. Piccinini, A. Tonello, B. Biasoli

Struttura Semplice di Ematologia di Laboratorio- Dipartimento di Medicina di Laboratorio-Azienda Ospedaliero Universitaria "Ospedali Riuniti di Trieste"

Scopo del lavoro. Valutare l'impatto dell'introduzione di un sistema gestionale automatizzato sull'efficienza del Laboratorio di Ematologia.

Materiali e metodi. La Struttura Semplice di Ematologia del nostro Dipartimento utilizza 4 analizzatori Coulter LH 750 (3 in routine, 1 in urgenza) gestiti da un sistema gestionale automatizzato dedicato all'ematologia (Hematology Manager). Tale sistema prevede un unico interfacciamento al LIS, la gestione centralizzata dei QC e della validazione dei risultati (automatica o manuale in base a regole decisionali stabilite dal Laboratorio), la consultazione e la revisione dei dati da terminali posizionati nelle sedi più idonee (presso gli strumenti, presso i microscopi, in sedi remote), la creazione di un archivio storico. Per valutare l'impatto di questo sistema sull'efficienza operativa dell'attività di ematologia abbiamo considerato i seguenti parametri: gestione dei flussi di lavoro e dei QC, validazione tecnica e medica, tempi di refertazione, revisioni al microscopio ottico (M.O.), qualità dei dati e dell'informazione.

Risultati. Il caricamento random degli strumenti, la gestione centralizzata dei QC, la visibilità in tempo reale dello stato dei campioni (validato, in ripetizione, in striscio...) consente di razionalizzare l'utilizzo delle risorse tecniche ed umane riducendo i tempi di esecuzione analitica. Il sistema di validazione consente di refertare automaticamente i campioni non soggetti a revisione rendendoli disponibili, in tempo reale, ai curanti che possono visualizzarli dai terminali di reparto collegati col LIS. Il flusso di lavoro consente l'allestimento manuale degli strisci e la loro osservazione microscopica nel corso dell'attività analitica. L'introduzione dei dati numerici e dei commenti direttamente dalla tastiera del terminale posto vicino al M.O. elimina una serie di passaggi. La presenza di un archivio storico per paziente e per patologie, nel quale sono memorizzabili immagini trasmesse dal M.O., migliora notevolmente, per il medico del Laboratorio, la qualità delle informazioni sui pazienti.

Conclusioni. L'utilizzo del sistema gestionale automatizzato consente una miglior organizzazione del lavoro, la centralizzazione della gestione, la standardizzazione di molte procedure e la riduzione complessiva dei tempi di refertazione. La presenza dell'archivio storico, aumentando la conoscenza sui pazienti, consente un intervento di validazione medica più mirato ed un più produttivo confronto con il clinico.

VERIFICA DEI CRITERI DI SELEZIONE MEDICA DEGLI STRISCI PERIFERICI**A-11****P. Doretto, E. Barzon, P. Bulian e P. Cappelletti**

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Patologia Clinica, AOSMA Pordenone

Scopo del lavoro: valutare i livelli minimi decisionali per eseguire lo striscio periferico degli emocromi, basati su soglie quantitative per CBC e DIFF, flags morfologici sia standard che strumento specifici per RBC e WBC e valutazione globale.

Materiali e metodi: su 5134 emocromi consecutivi (4733 con formula) di routine su ADVIA 120 Bayer, sono stati bloccati dalle soglie strumentali predefinite 2983 campioni (41.9%); di questi 635 (12.4% complessivi, 13.4% di quelli con formula) sono stati strisciati per la revisione microscopica. Dei livelli minimi decisionali per eseguire lo striscio abbiamo tralasciato quelli "a discrezione" (linfopenia, LUC, Dev. Sin, flags morfologici RBC); abbiamo considerato tra i flags morfologici anche Aggregati Plt e NRBC (eritroblasti), con COMBO i campioni strisciati per più di un criterio e con Valutazione Globale quelli strisciati per l'aspetto dei citogrammi/istogrammi, età, provenienza, precedenti.

Risultati: il principale criterio di revisione è risultato COMBO (40.3%) seguito da RDW>19% (24.1%), Atipici (20.2%), PLT<80*103/?L (17.3%), IG (17%), MCV<75fL (13.7%), Blasti (12.1%), MCV<105fL (12%), WBC<2.5*103/?L (8.2%), neutrofili<1.0*103/?L (7.4%), PLT>600*103/?L (7.2%), Valutazione globale (6.9%), NRBC (6.5%), linfociti>4.5*103/?L (5.4%), Aggregati Plt (3.6%), MCHC<29g/dL (2.8%), MPOd (2.0%), WBC>30*103/?L (1.9%), monociti>1.5*103/?L (1.9%), basofili>0.2*103/?L (1.6%), RBC>6.0*106/?L (1.6%), Hb<7.0g/dL (0.9%), eosinofili>1.5*103/?L (0.5%), Ht>60% (0.2%) e MCHC>36g/dL (0.2%). 70 strisci (11%) non hanno subito modifiche nei dati di CBC+DIFF e sono stati commentati con "Non alterazioni morfologiche degne di rilievo". La corrispondenza tra flag morfologico e commento è stata per IG 80,6%, Aggregati plt 34,8, NRBC 34,1%, Blasti 28,6%, Atipici 21,1%. Piastrinopenie e piastrinosi hanno avuto un commento specifico nel 33,6 e 32,6% dei casi. Commenti significativi (aggiuntivi e non puramente descrittivi di quanto già rilevabile dai dati numerici di CBC+DIFF) sono stati fatti in 477 (75,1%) strisci (RBC 71,1%, WBC 27,5%, PLT 21,2%, COMBO 16,4%); i più frequenti per RBC: anisocitosi (62,3%), poichilocitosi (34%), policromasia (11,3%), elementi patologici quali schistociti o altri (5,7%), doppia popolazione (82,3%); per WBC: Arneht/N attivati/forme immature rare (8,6%), Linfociti attivati (7,8%), displasia/atipia N o Mono (6,1%), Linfociti atipici (4,6%), MPOd (0,8%); per PLT: anisocitosi (11,9%), plt giganti (6,7%), aggregati (6,1%) e crioglobuline (1%).

Discussione e conclusioni: la corrispondenza tra campioni strisciati e commentati è elevata (89%) e così pure la quota di commenti significativi, prevalentemente legati alla morfologia dei RBC. La specificità degli allarmi morfologici appare buona per IG, modesta per gli altri.

CONTEGGIO RETICOLOCITARIO AUTOMATIZZATO: VALUTAZIONE NCCLS H-44 ED ICSH SU 5 STRUMENTI**A-12****P. Doretto, B. Biasioli, B. Casolari, L. Pasini, P. Bulian, M. Buttarello, A. Cenci, G. Da Rin, V. Miconi, C. Piccinini, E. Piva, P. Cappelletti**

Gruppo di studio in Ematologia SIMeL (GdSE)

Scopo del lavoro: confrontare il conteggio reticolocitario automatizzato fornito da ADVIA (Bayer), CD4000 (Abbott), LH-750 (Coulter), PENTRA (ABX), XE 2100 (Dasit), secondo il protocollo NCCLS H44-A2 e ICSH.

Materiali e metodi: 332 campioni di sangue periferico prelevato in EDTA sono stati analizzati in duplicato entro 6 ore dal prelievo su ciascun analizzatore. Per ogni campione sono stati preparati due vetrini per la lettura manuale dei reticolociti, colorati con NMB. I conteggi di riferimento sono stati eseguiti da due coppie di osservatori esperti prequalificati, con microscopio binoculare. La precisione nella serie è stata calcolata con ANOVA, l'accuratezza è stata valutata mediante grafici con bande di tolleranza binomiali, regressioni lineari e bias plot.

Risultati: gli intervalli di riferimento per la concentrazione reticolocitaria sono strumento dipendenti (ADVIA 33-104, CD4000 28-119, LH 750 18-114, PENTRA 30-105, XE 2100 27-99, riferimento 29-129, unità 109/L). Anche gli intervalli di riferimento per la frazione di immaturità reticolocitaria (IRF) risultano strumento dipendenti (Advia 0.06-0.20, CD4000 0.20-0.40, LH 750 0.22-0.40, Pentra 0.09-0.17, XE 2100 0.02-0.11). L'imprecisione nel conteggio reticolocitario assoluto è risultata variabile tra strumenti (per i valori bassi il CV oscilla dal 10,2% a 40,7%, per i valori entro l'intervallo di riferimento il CV varia da 5,2% ad 11,2%). Le regressioni lineari con il metodo di riferimento mostrano pendenze variabili da 0,75 a 0,90, intercette variabili da 0,02 a 0,19 ed r² variabile da 0,89 a 0,96.

Discussione e conclusioni: gli intervalli di riferimento per concentrazione reticolocitaria ed IRF sono strumento dipendenti, come già osservato in letteratura. Imprecisione ed inaccuratezza risultano globalmente entro limiti accettabili, mentre nell'ambito delle basse concentrazioni, anche se non in tutti i casi, la tecnologia automatizzata si rivela non del tutto affidabile. Alcuni strumenti mostrano da una parte un'imprecisione eccessiva, dall'altra una inaccuratezza significativa, in quanto aplasie con conteggi di riferimento bassi, risultano nell'ambito normale per il conteggio strumentale. Per questo per il conteggio reticolocitario sarebbe utile implementare delle regole di validazione, basate su altri dati emocromocitometrici e/o sul controllo dei precedenti e/o su notizie cliniche, che consentano di individuare i campioni che richiedono una verifica microscopica.

RBC-Y E RET-Y: DUE NUOVI PARAMETRI DELL'ANALIZZATORE EMATOLOGICO SYSMEX XE-2100 COME POTENZIALI INDICATORI DI CARENZA DI FERRO IN PAZIENTI DIALIZZATI

A-13

M. Maconi*, D. Formisano§, M. Gregorini°, M. Morini*, M. Brini*

*U.O.Laboratorio Analisi Chimico Cliniche § Servizio Sviluppo Organizzativo° U.O.Nefrologia e Dialisi; Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

Scopo del lavoro: La carenza funzionale di ferro è il maggiore fattore che limita la risposta alla terapia con Eritropoietina ricombinante (rHuEpo). La diagnostica di laboratorio dello stato marziale si basa anche su test ematologici. Attualmente vengono utilizzati la percentuale di emazie ipocromiche (%Hypo) e il contenuto emoglobinico reticolocitario (CHR) forniti dall'analizzatore ematologico ADVIA120 (Technicon, Bayer). Due nuovi parametri calcolati, RBC-Y e RET-Y, vengono determinati nel canale dei reticolociti dall'analizzatore Sysmex XE-2100 ((Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Sembra, infatti, che correlino con la forma e con il contenuto di emoglobina dei globuli rossi e dei reticolociti. Lo scopo del nostro lavoro è quello di confrontare i valori ottenuti di RBC-Y con % Hypo e di RET-Y con CHR in un campione di pazienti dializzati, per dare a questi due nuovi parametri un significato diagnostico nella carenza funzionale di ferro.

Materiali e Metodi: I campioni per emocromo, raccolti in K3EDTA, 70 pazienti dializzati (36 maschi e 34 femmine) in trattamento con rHuEpo, sono stati analizzati entro due ore dalla raccolta con l'analizzatore ADVIA120 e XE-2100. E' stata eseguita una analisi descrittiva del campione attraverso i principali parametri statistici. Inoltre è stata calcolata la correlazione tra i parametri RBC-Y e %Hypo e RET-Y e CHR utilizzando il coefficiente di correlazione di Spearman.

Risultati: I valori ottenuti per i singoli parametri nel campione analizzato sono: RBC-Y mediana=176,6 IR95=161,0-189,1; %Hypo mediana=3% IR95=02-20%; RET-Y mediana=1889 IR95=1571-2041; CHR(pg) mediana=33,1 IR95=27,9-39,1. Il coefficiente di correlazione tra RBC-Y e %Hypo è risultato $r=-0.45$ e quello tra RET-Y e CHR $r=0.93$. Pertanto, risulta una ottima correlazione positiva tra RET-Y e CHR, mentre solo una discreta correlazione negativa tra RBC-Y e %Hypo.

Discussione e Conclusioni: La ricerca di nuovi indicatori di carenza marziale che dipendano solo dal metabolismo del ferro e non siano influenzati da fattori patologia specifici, alimenta l'interesse a sperimentare nuovi parametri. Il nostro studio preliminare dimostra che RET-Y costituisce un buon indicatore nella diagnosi della carenza marziale, mentre RBC-Y ha una discreta correlazione con %Hypo. E' in corso di valutazione una sua eventuale correlazione con altri parametri eritrocitari.

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI POSIZIONALI DEL SISTEMA EMATOLOGICO TOA-SYSMEX XE-2100 IN UNA POPOLAZIONE NORMALE

A-14

D. Campioli, AM. Ottomano, L. Simoni, G. Bergonzini, C. Chiodino, L. Canovi, A. Carbonieri

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

Scopo del lavoro: Il sistema Toa-Sysmex XE-2100 fornisce un esame emocromocitometrico completo con conteggio leucocitario differenziale eseguito mediante tecnologia ottica e utilizzo di un colorante fluorescente. Il risultato di tale analisi viene rappresentato graficamente sul citogramma DIFF dove i cluster relativi alle varie popolazioni cellulari hanno una distribuzione caratteristica. La presenza di cellule con distribuzione anomala determina la comparsa di una serie di allarmi (flag) morfologici che avvertono l'operatore della sospetta presenza di elementi patologici in funzione della loro posizione nel citogramma. Consultando il programma di gestione in una pagina di servizio si possono inoltre osservare parametri di ricerca il cui significato ed utilizzo sono tuttora in corso di studio. In particolare nella pagina di servizio del canale DIFF si trovano, tra gli altri i parametri NEUT-X, NEUT-Y, LYMPH-X e LYMPH-Y che si possono definire come le coordinate di distribuzione delle popolazioni dei Neutrofili e dei Linfociti nel citogramma. Scopo del nostro lavoro era di valutare la possibilità che questi parametri forniscano informazioni complementari su aspetti qualitativi delle popolazioni cellulari esaminate. Abbiamo esaminato il comportamento di tali parametri in una popolazione normale.

Materiale e metodi: abbiamo eseguito l'esame emocromocitometrico mediante sistema Toa Sysmex XE-2100 in modalità CBC + DIFF su 200 campioni di sangue periferico raccolto in EDTA(K3), selezionati come normali in base al numero di GB (> 4000 e < 10000) e all'assenza di qualunque flag morfologico. Di questi campioni abbiamo considerato i parametri NEUT-X, NEUT-Y, LYMPH-X e LYMPH-Y calcolandone la media e la deviazione standard (DS); abbiamo poi definito il range di riferimento applicando la formula: media + o - 2DS, dopo eliminazione dei risultati aberranti.

Risultati: i valori medi e i range dei parametri valutati sono i seguenti: NEUT-X 1348 (1282-1415), NEUT-Y 433 (374-493), LYMPH-X 880 (821-939) e LYMPH-Y 633(563-702).

Discussione e conclusioni. La definizione di intervalli di riferimento dei parametri studiati per un gruppo significativo di campioni normali sono la necessaria premessa per la ricerca di eventuali scostamenti da tali intervalli e la loro correlazione con aspetti patologici delle popolazioni cellulari analizzate.

**EMOCROMOCITOMETRIA NEONATALE:
CONFRONTO FRA ADVIA 120-BAYER E XE 2100-DASIT**

A-15

S. Leoncino, L. Norese, D. Serra, P. Tenerelli, E. Intra

Laboratorio Analisi - Ospedale Evangelico Internazionale - Genova

Scopo del lavoro. È stato valutare e correlare i principali parametri emocromocitometrici ottenuti da campioni di sangue neonatale prelevati in prima giornata da vena cefalica. Esistono difficoltà tecniche per la valutazione di campioni neonatali a seconda del tipo di prelievo (da cordone ombelicale, sangue venoso, sangue capillare) e dei giorni trascorsi dalla nascita. Inoltre i neonati possono andare incontro ad anemia da diminuita produzione, perdita o distruzione di emazie (anemia emolitica). Per questa serie di motivi la determinazione dell'esame emocromocitometrico presenta delle peculiarità interpretative diverse rispetto a quelle dell'adulto.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati in doppio su entrambi gli strumenti 129 campioni neonatali di cui 102 campioni (nati a termine) con valori normali, 8 PEG (piccoli per età gestazionale), 19 affetti da altre patologie (ittero emolitico, distress respiratorio, infezioni).

Risultati. Vedi tabella 1.

Discussione e conclusioni. L'analisi statistica conferma la buona correlazione tra i due strumenti. La regressione di Passing e Bablok consente di affermare che i dati di tutti i parametri sono allineati ad esclusione della formula leucocitaria, dove il massimo scarto si riscontra per i granulociti basofili ed i monociti.

Tabella 1 – Coefficienti di correlazione parametri emocromocitometrici (Advia 120 e XE 2100)

	Coefficiente di correlazione (r)		Coefficiente di correlazione (r)
Globuli bianchi	0.982	Gran. Neutrofil	0.9565
Globuli rossi	0.975	Linfociti	0.9398
Emoglobina	0.9952	Monociti	0.7886
Ematocrito	0.9778	Gran. Eosinofili	0.9744
MCV	0.9739	Gran. Basofili	0.3557
Piastrine	0.9833	Eritroblasti	0.7397

PROTOCOLLI OPERATIVI PER IL REFERTO EMATOLOGICO IN URGENZA

A-16

M. Morandini, F. Falcomer, N. Retto, P. Pascutto, L. Laghi, F. Grizzo, A. Di Monte, A. Coghetto, B. Bertoli (Gruppo Settore Urgenze), P. Cappelletti

Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, AOSMA, Pordenone

Premessa: Il referto ematologico in urgenza prevede un processo di significazione diverso rispetto a quello di elezione: dov'è richiesto il rilascio immediato dei risultati al clinico, sia la validazione tecnica che la validazione biologica del dato analitico è competenza del TLBM.

Scopo del lavoro: Verifica della performance dei Protocolli Operativi per la valutazione dei risultati emocromocitometrici e la produzione del referto ematologico in urgenza e verifica del grado di applicazione da parte dei TLBM del Settore Urgenze.

Materiali e Metodi: I Protocolli prevedono, per la validazione tecnica, la verifica del dato ottenuto con i metodi del controllo di qualità, della performance analitica, delle interferenze conosciute e del controllo degli errori formali; per la validazione biologica, la verifica del dato verso la variabilità intra e interindividuale e delle interferenze biologiche, la valutazione trasversale verso gli intervalli di riferimento e la valutazione di congruità e plausibilità. Le verifiche sono di 3 livelli. Nel 1° rientrano la verifica dei fattori preanalitici e postanalitici generici; nel 2° la verifica dei valori critici di WBC, RBC, HGB, PLT; nel 3° la notifica dei dati critici al Medico Reperibile ed un eventuale revisione microscopica dello striscio periferico e la notifica dei dati critici al Clinico.

La valutazione della performance dei Protocolli e della loro applicazione è avvenuta su 5369 esami emocromocitometrici (CBC).

Risultati: Sulla base dei Protocolli sono stati selezionati 365 campioni (6,8% del totale) con un impegno di validazione (tempo medio 10") relativo ai diversi parametri pari al 3,4% per PLT, 1,3%WBC, 1,3%HGB, 0,7%CBC per le verifiche di 1° livello; l'applicazione delle verifiche di 2° livello è avvenuta nel 10,3%PLT, 11,1%WBC, 26,5%HGB, 95%CBC dei selezionati. Le verifiche di 3° livello hanno implicato nel 14,5% dei casi la richiesta di un altro campione per riconferma, nel 2,4% la revisione microscopica dello striscio periferico; inoltre è stato riscontrato il 2,4% di emocromi diluiti, il 3,6% di campioni non idonei e 1,2% di scambio pazienti. Sono stati notificati i dati critici al Reparto/Clinico nel 24,1% dei casi (tempo medio 20"). Il livello di applicazione è stato del 98,2%.

Discussione e Conclusioni: I Protocolli Operativi di validazione del dato analitico consentono di standardizzare comportamenti corretti (98,2% di applicazione in un gruppo di 8 persone) e migliorare ulteriormente le fasi preanalitica (evitati 6 errori preanalitici gravi), analitica e postanalitica (84 dati critici comunicati al Clinico), producendo un dato clinicamente efficace e sicuro, con impegno temporale contenuto.

RANGE DI NORMALITÀ DELL'INDICE RET-Y NELL'ANZIANO**A-17****M. Nicoli¹, R. Marchetti¹, C. Lonardoni¹, R. Marcori¹, A. Cabrini¹, U. Tellini², L. Pellizzari², L. Corrà², P. Rizzotti¹**¹ Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera di Verona² Dipartimento di Geriatria, Azienda Ospedaliera di Verona

Scopo del lavoro. Tra gli indici reticolocitari il CHr, (contenuto emoglobinico eritrocitario medio), ottenuto con la tecnologia Bayer ADVIA 120, è il parametro con maggior rilevanza clinica. Il CHr riflette la sintesi emoglobinica recente nei precursori emopoietici del midollo. È stata valutata la concordanza ($r=0.94$) (1) tra il CHr e il parametro RET-Y (valore medio del forward-scattered-light nei reticolociti maturi) ottenuto con la tecnologia Sysmex XE2100. Inoltre è stato studiato l'utilizzo clinico nelle diagnosi e nel monitoraggio dei pazienti con anemia sideropenica. Lo studio si prefigge di individuare i valori di normalità dell'indice RET-Y nella popolazione anziana.

Materiali e metodi. Il lavoro è condotto su soggetti anziani, ricoverati presso il dipartimento di Geriatria dell'Azienda Ospedaliera di Verona. Sono esclusi dall'indagine i soggetti con anemia ($Hb < 125$ g/L) e con quadro clinico notevolmente compromesso. I soggetti dello studio sono 173, di cui 71 maschi e 102 femmine. L'età media è di 79 anni con DS 7.03. In ciascun soggetto vengono individuati sesso, età in anni, classe d'età di appartenenza (< 70, 70-74, 75-79, 80-84, 85-89, > 89), emocromo con reticolociti, ferritina, recettore solubile della transferrina e RET-Y. L'analisi statistica viene svolta sull'intero campione e suddividendo i pazienti in funzione del sesso e/o della classe d'età di appartenenza e si avvale del t di Student per dati appaiati, del test F di Snedecor per il confronto fra più gruppi, dell'analisi della regressione nel confronto fra variabili quantitative.

Risultati. Risultati riguardanti RET-Y: media 1818, DS 110.8, mediana 1833, valore minimo 1386, valore massimo 2066, range di normalità (calcolato al 2.5-97.5 percentile) 1535-1978. Si sottolinea che RET-Y non è relata all'età dei soggetti e non è influenzato dal sesso (il campione può costituire quindi un unico gruppo), mentre correla in modo diretto e statisticamente significativo con MCV (coefficiente di correlazione lineare $r=0.35$ con $t=4.88$ e $p<0.01$) e con MCHC (coefficiente di correlazione lineare $r=0.24$ con $t=3.16$ e $p<0.01$).

Discussione e Conclusioni. Nell'anziano non anemico si osservano valori di RET-Y diversi rispetto all'adulto (1661-1820) (1) ed il range di normalità mostra una estensione più ampia. Il disporre di valori di riferimento su tale popolazione, permetterà l'approfondimento sull'utilizzo del test nella diagnosi e nel monitoraggio dei soggetti anemici sideropenici.

Bibliografia. (1) The New Reticulocyte Parameter (RET-Y) of the Sysmex XE2100. M. Buttarello. Am J Clin Pathol 2004;121:489-495.

CITOGRAMMI DELL'ANALIZZATORE EMATOLOGICO SYSMEX XE 2100: QUALITÀ DELL'INFORMAZIONE DIAGNOSTICA**A-18****A. La Gioia, I. Chiapponi, A. Matteucci, M. Fiorini, P. Petricci**

UO Patologia Clinica Azienda USL 6 Livorno

Scopo del lavoro. Raccolta di informazioni diagnostiche dai citogrammi dell'analizzatore ematologico Sysmex XE-2100.

Materiali e metodi. Routine ematologica giornaliera (ca 700 emocromi). Analizzatore ematologico XE-2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Risultati. Nel periodo di osservazione di 9 mesi su un totale di 14 leucemie acute diagnosticate, sono stati osservati 2 casi di leucemia monocitica acuta in cui è stato possibile rilevare una morfologia univoca del cluster dei leucociti non polimorfonucleati (PMN) basofili osservabile nel citogramma WBC/Baso.

Discussione e Conclusioni. XE 2100 utilizza 3 citogrammi per fornire informazioni sulla popolazione leucocitaria. Il canale Diff con informazioni di Side scatter (SSc) e di Side fluorescence (SFI) consente l'individuazione delle quattro principali popolazioni leucocitarie (neutrofili, linfociti, monociti ed eosinofili). Il canale IMI in base a segnali di corrente diretta DC (informazioni di volume) e di radio frequenza RF (informazioni di complessità) consente la individuazione di forme cellulari immature. Infine il canale WBC/Baso con misure di Forward scatter (FS) e Side scatter (SSc) consente di visualizzare due clusters distinti: uno rappresentato dalla popolazione dei basofili, l'altro dai restanti leucociti e da eventuali eritroblasti. Il cluster dei leucociti non PMN basofili risulta essere la sommatoria dei vari clusters delle singole popolazioni che lo compongono. Ciò appare particolarmente evidente nelle condizioni di neutrofilia e linfocitosi in cui le due componenti vengono evidenziate graficamente in maniera sequenziale lungo la bisettrice dell'asse cartesiano: la prima corrispondente alla popolazione dei PMN neutrofili, la seconda a quella dei linfociti. Nelle leucosmi acute maligne le informazioni derivanti dall'osservazione della morfologia dei clusters evidenziabili nei vari diagrammi, se si esclude l'indicazione dell'esistenza di cellule immature della serie bianca granulosa, generalmente non fornisce informazioni utilizzabili dal punto di vista diagnostico. Tuttavia l'osservazione critica della morfologia dei clusters evidenziati nel canale WBC/Baso può, in alcune condizioni ematologiche, fornire utili informazioni. In almeno due casi di Leucemia Monocitica Acuta arrivati alla nostra osservazione è stato possibile evidenziare una particolare morfologia del cluster riguardante i leucociti non PMN basofili, rappresentato da uno sdoppiamento della popolazione caratterizzato da una componente localizzata al di sopra della bisettrice dell'asse cartesiano del diagramma, l'altra localizzata al di sotto. La nostra osservazione è in accordo con quanto riportato in letteratura in riferimento ad altre emopatie maligne appartenenti al gruppo 4 della classificazione WHO delle leucemie mieloidi acute.

VALUTAZIONE DEGLI ALLARMI STRUMENTALI DEDICATI ALLA SERIE LINFOIDE E CORRISPONDENZA MORFOLOGICA

A-19

B. Casolari[°], M. Maconi^{*}, L. Cavalca^{*}, A. Coco[°], F. Torricelli[°], AM. Cenci[°]

[°]Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale S. Agostino, Modena; ^{*}Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia

Scopo del lavoro: Un incremento del numero assoluto dei linfociti del sangue periferico (>4000/mm³ nei soggetti adulti; >7500/mm³ in età pediatrica) può osservarsi in numerose patologie e può presentare una natura policlonale o monoclonale. Il riconoscimento delle varianti linfocitarie costituisce a tutt'oggi un problema degli analizzatori ematologici. Sysmex XE-2100 dedica diverse segnalazioni (Lymphocytosis, Atypical Lympho, Abn Lympho/ L-Blasts, WBC Abnormal Scattergram, Blasts) alle anomalie quantitative e morfologiche dei linfociti. Scopo del lavoro è valutare la possibile corrispondenza tra allarmi strumentali e morfologia cellulare della serie linfoide.

Materiali e Metodi: Sono stati analizzati 1714 campioni provenienti da pazienti esterni ambulatoriali afferenti ai nostri laboratori di riferimento nello scorso giugno. I campioni raccolti in K3 EDTA e sottoposti ad analisi con Sysmex XE-2100, sono stati suddivisi in 3 gruppi: età pediatrica (< 16 anni), adulti e anziani (>65 anni). Il controllo al microscopio ottico è stato eseguito secondo il protocollo NCCLS H20A.

Risultati: 123 dei 1714 campioni analizzati sono risultati positivi per allarmi linfocitari. Gli allarmi si presentano singolarmente o combinati in modo variabile (2,3), sia distribuzionale che morfologico. Monoallarme: Lymphocytosis 40 casi (23%), Atypical Lympho 16 (13.3%), Abn Lympho/ L-Blasts 44 (36%). In tutte le età Atypical Lympho corrisponde ad elementi linfocitari attivati (linfociti iperbasofili, immunoblasti, plasmacellule) e associati a morfologie tipiche dello scattergram DIFF. Abn Lympho/ L-Blasts da solo in tutte le età corrisponde a elementi linfocitari attivati di taglia medio-grande. In 2 casi non ha corrispondenza morfologica con manifestazioni di attivazione linfocitaria. Combinati: Lymphocytosis / Atypical Lympho 3 (2.7%); corrisponde sempre a linfociti attivati. Lymphocytosis / Abn Lympho/ L-Blasts 19 (15%): nel 60%, tutti anziani, è presente patologia linfoproliferativa, nel 40% degli altri gruppi vi sono cellule da attivazione linfocitaria (mai con morfologia plasmacellulare). Lymphocytosis / Atypical Lympho/ Abn Lympho/ L-Blasts: forte attivazione con morfologia linfocitaria polimorfa (linfociti iperbasofili, immunoblasti, plasmacellule).

Discussione e Conclusioni: Nello studio non si identificano corrispondenze strumento-morfologiche inequivocabili. Unico costante suggerimento di attivazione sembra riferibile alla presenza della segnalazione Atypical Lympho. Informazioni aggiuntive provengono da un'accurata osservazione degli scattergram.

IMMATURITÀ MIELOIDE E RILEVAZIONE STRUMENTALE

A-20

AM. Cenci[°], B. Casolari[°], M. Maconi^{*}

[°]Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda AUSL Ospedale S. Agostino, Modena; ^{*}Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia.

Scopo del Lavoro: Pur mantenendo importanza di rilevazione in condizioni di patologie primitive o secondarie della serie bianca e più in generale in accompagnamento a molte altre situazioni reattive, para-fisiologiche e patologiche, il riconoscimento delle cellule mieloidi immature e la capacità di quantizzarle in maniera accurata e corretta rimane a tutt'oggi uno dei problemi presenti in Ematologia automatizzata. Risulta quindi giustificato lo sforzo della ricerca tecnologica nel mettere a punto sistemi per Ematologia in grado di fornire notizie a proposito. Il presente lavoro descrive la performance di due strumentazioni di terza generazione testate e messe a confronto nello studio di queste cellule e nella qualità della risposta.

Materiali e Metodi: Sono stati analizzati 132 campioni provenienti da pazienti interni ed esterni ambulatoriali afferenti al Laboratorio dell'Ospedale S. Agostino, AUSL di Modena. I campioni, raccolti in K3 EDTA, sono stati sottoposti ad analisi con Sysmex XE 2100 e Abx Pentra DX 120 e sono risultati positivi per presenza di elementi immaturi mieloidi all'esame strumentale. I due sistemi rilevano questo cluster cellulare attraverso dati quantitativi, allarmi e grafici dedicati. La revisione microscopica di conferma è stata eseguita secondo il protocollo NCCLS H20A. I campioni presentavano al microscopio tutte cellule immature mieloidi a varie concentrazioni, da minime a conclamate, a volte anche segni di displasia.

Risultati: L'elaborazione dei dati, pur preliminari, riporta una corrispondenza pressoché totale di segnalazione della presenza di cellule immature tra lettura microscopica ed entrambe le analisi strumentali a tutte le concentrazioni testate di cellule, anche se in presenza di elementi displastici. La quantizzazione fornita dai sistemi risulta sostanzialmente sovrapponibile, così come la specificità delle immagini dei grafici dedicati, ciascuno nella sua espressione.

Discussione e Conclusioni: La rilevazione e la segnalazione degli elementi immaturi data dagli strumenti risulta affidabile ed utile soprattutto in situazioni di monitoraggio; spesso immagini tipiche dei grafici suggeriscono agli operatori la natura mieloidi di cluster cellulari atipici o displastici. La quantizzazione fornita dal sistema può essere utilizzabile nel seguire l'evoluzione del quadro ematico in alcuni particolari pazienti, compresi follow up, monitoraggi terapeutici, reazioni leucemoidi, patologie ematologiche, ed altre.

UTILITÀ CLINICA DI ALLARMI STRUMENTALI NEI PROTOCOLLI DI SCREENING DELLE PATOLOGIE LINFOPROLIFERATIVE NELL'ANZIANO

A-21

AM. Cenci^o, B. Casolari^o, L. Albertazzi*, M. Bertoldi*, M. Maconi*

^o Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale S. Agostino, Modena;

* Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia

Scopo del lavoro: La capacità di risposta e la diversità del repertorio dei linfociti B diminuisce con l'età, forse legata ad una espansione clonale dei linfociti B. L'analizzatore ematologico Sysmex XE-2100, attraverso un'analisi paragonabile a quella citofluorimetrica, sfruttando principio ottico e reattivi dedicati, presenta per la serie linfocitaria alcuni allarmi strumentali, che dovrebbero descrivere i diversi tipi di varianti per funzione o patologia. Tra questi, l'allarme Abn Lympho /L- Blasts sembra rivestire particolare importanza in quanto spesso correlato ad alterazioni morfologiche di maggior gravità (patologie linfoproliferative). Scopo del presente lavoro è quello di verificare se l'allarme Abn Lympho /L- Blasts possa essere utilizzato come elemento di screening nel suggerire la presenza di una clonalità dei linfociti B negli anziani.

Materiali e Metodi: Sono stati analizzati 1714 campioni provenienti da pazienti ambulatoriali asintomatici per patologie linfoproliferative accertate, afferenti ai laboratori nel mese di giugno 2004 e di questi sono stati considerati i 54 campioni positivi per l'allarme Abn Lympho /L- Blasts da solo o associato a linfocitosi (>4000/mm³). I campioni, raccolti in K3 EDTA, sono stati analizzati con il sistema Sysmex XE-2100, sortati per la presenza dell'allarme e verificati al microscopio ottico secondo i comuni protocolli in uso. Per l'analisi citofluorimetrica sono stati utilizzati lo strumento XL Coulter e Moab della ditta Dako.

Risultati: Dei 54 campioni positivi per l'allarme Abn Lympho /L- Blasts, 23 (43%) sono persone anziane (> 65 anni) asintomatiche per patologie linfoproliferative. E' stato possibile eseguire la tipizzazione linfocitaria in 15 campioni: 10 campioni (70%) sono risultati essere veri positivi per patologie linfoproliferative.

Discussione e Conclusioni: I risultati preliminari sembrano indicare che la presenza dell'allarme Abn Lympho /L- Blasts negli anziani, in qualche caso da solo, più comunemente in associazione con linfocitosi anche minime, può giustificare di per sé la revisione microscopica e una valutazione citofluorimetrica di screening per lo studio di patologie linfoproliferative anche in prima battuta e in individui fino a questo momento asintomatici.

SENSIBILITÀ CLINICA DEGLI ALLARMI MORFOLOGICI LEUCOCITARI DEGLI ANALIZZATORI EMATOLOGICI: STUDIO DI 334 CASI SECONDO PROTOCOLLO NCCLS H20-A

A-22

Gruppo di studio in Ematologia SIMeL (GdSE): P. Bulian, A. Cenci, C. Piccinini, V. Miconi, E. Piva, M. Buttarello, B. Biasioli, B. Casolari, G. Da Rin, P. Doretto, L. Pasini, P. Cappelletti

Scopo del lavoro: Confrontare la sensibilità clinica per gli allarmi morfologici leucocitari su 5 strumenti con tecnologia differente e valutarne le possibili ricadute nell'attività di routine.

Materiali e metodi: 334 campioni di sangue periferico prelevato in EDTA da soggetti normali (n. 143) e patologici (n. 191) sono stati analizzati su ADVIA 120 (Bayer), CD 4000 (Abbott), LH-750 (IL-Coulter), PENTRA (ABX) e XE-2100 (Dasit). I conteggi di riferimento sono stati eseguiti da 4 osservatori, per un totale di 800 elementi, su strisci colorati allestiti in parallelo. L'allarme morfologico per i conteggi di riferimento è scattato per blasti >0.5%, granulociti immaturi (IG) >1%, eritroblasti (NRBC) >1%, linfociti atipici >0.5%. Per ciascuno strumento sono state calcolate sensibilità, specificità e concordanza (global agreement), sia per i singoli allarmi che per "allarme globale" (i 4 allarmi insieme).

Risultati: Sensibilità e specificità sono risultate per i blasti rispettivamente ed in ordine (ADVIA; CD-4000, LH-750, PENTRA, XE-2100) 91.3% e 84.6%, 87.0 e 94.9, 47.8 e 98.1, 4.3 e 100.0, 78.3 e 95.5; per IG 65.6 e 85.8, 68.8 e 86.8, 40.6 e 96.4, 31.3 e 96.0, 93.8 e 89.1; per NRBC 42.9 e 97.8, 52.4 e 100.0, 33.3 e 96.8, 9.5 e 99.7, 95.2 e 98.7; per i linfociti atipici 38.7 e 97, 48.4 e 92.1, 9.7 e 97.4, 25.8 e 95.7, 22.6 e 95.4. I falsi negativi contemporanei sui 5 strumenti sono in totale 13, tutti per l'allarme linfociti atipici. Limitatamente ai 3 strumenti con le migliori sensibilità cliniche (ADVIA, CD-4000, XE-2100), l'allarme morfologico vero positivo è stato rilevato da un unico strumento: in 5 casi da XE-2100 (3 NRBC, 2 IG) in 4 casi da ADVIA (2 IG, 1 linfociti atipici, 1 blasti) e in 2 casi da CD4000 (2 linfociti atipici). L'allarme globale è presente in 119 casi per ADVIA, 89 casi per CD4000, 50 casi per LH-750, 35 casi per PENTRA, 80 casi per XE-2100; la sensibilità per l'allarme globale è 80.9% per ADVIA, 61.8 per CD4000, 41.2 per LH-750, 41.2 per PENTRA e 76.5 per XE-2100.

Discussione e conclusioni: La migliore sensibilità per blasti è di ADVIA, per IG di XE-2100, per NRBC di XE-2100, per linfociti atipici di CD4000. Ipotizzando che nella routine un caso allarmato morfologicamente venga comunque verificato microscopicamente, risulta che la sensibilità globale per anomalie morfologiche è in ordine migliore per ADVIA, XE-2100, CD4000, PENTRA, LH-750. La concordanza globale, escludendo PENTRA ed LH-750, risulta migliore in ordine in XE-2100, CD4000 e ADVIA.

CONTENITORE MULTIMEDIALE PER CASI CLINICI DI MEDICINA DI LABORATORIO**A-23**

N. Federici*, **E. Scorcucchi**, **G. Antonucci****, **VM. Bonavia*****, **F. Bottan******, **G. di Tommaso****, **E. Forastiere*******, **F. Papa*******, **C. Gambetta***

*Ospedale S.Spirito ASL RME, **Az.Ospedaliera S.Giovanni – Addolorata - Calvary Roma,***Ospedale Grande degli Infermi Viterbo, ****Az.Ospedaliera S.Giovanni Evangelista Tivoli, *****Ospedale Fatebenefratelli - Isola Tiberina Roma

Scopo del Lavoro. Presentare un contenitore di informazioni cliniche e di laboratorio, relative a singoli casi clinici, in grado di permettere, sulla base di un'interattività individuale utente-programma, la simulazione di percorsi diagnostici di medicina di laboratorio.

Materiali e Metodi. Le immagini relative ai campioni biologici sono state acquisite in forma digitale dalla fotocamera Olympus 5050 e integrate su un supporto CD con file di testo, altri file di immagine ed accessi a banche dati. L'integrazione dei file è stata ottenuta con il programma Macromedia Director MX 2004 che permette lo sviluppo di applicativi multimediali per CD, DVD ed internet.

Risultati. I casi clinici vengono strutturati secondo una gerarchia che prevede informazioni iniziali obbligate (un referto di laboratorio di 1° livello) ed informazioni opzionali successive costituite da notizie anamnestico – clinico - diagnostiche, dalla possibilità di accedere, su specifica richiesta (tramite facsimile di modulo), ai risultati di indagini di laboratorio di 2° livello, con disponibilità dei risultati a seconda della congruità quantitativa e qualitativa della richiesta, e dalla possibilità di esaminare, tramite un microscopio "virtuale",

i preparati dei materiali biologici inerenti il caso in oggetto. Il microscopio "virtuale" è dotato di zoom e di cursori orizzontali e verticali che permettono di esaminare un "vetrino virtuale" formato dalle immagini dei singoli campi microscopici prescelti unite insieme a formare un'unica immagine digitale. In tal modo viene garantita l'individualità del processo di osservazione. Le informazioni opzionali sono adattabili alle specifiche dei singoli casi clinici ed espandibili ad altre funzioni (accessi a banche dati tramite internet, iconografie dedicate...).

Discussione e Conclusioni. La presentazione informatica di casi clinici di medicina di laboratorio a fini formativi (prevalentemente a distanza) è generalmente caratterizzata da percorsi a "senso unico" con messa a disposizione totale delle relative informazioni. Questa impostazione priva il percorso informatico della possibilità di interazione ed impedisce di fatto la simulazione della reale attività diagnostica di laboratorio. Il prodotto presentato ha caratteristiche interattive tali da garantire un adeguato scenario diagnostico virtuale principalmente per i casi clinici in cui l'iconografia microscopica è un momento imprescindibile del percorso diagnostico.

VALUTAZIONE PRELIMINARE DEL CONTENUTO IN FATTORI DELLA COAGULAZIONE NEL PLASMA A SECONDA DELLE MODALITÀ DI LAVORAZIONE E CONGELAMENTO

A-24

S. Valverde¹, **G. Gessoni¹**, **E. Beltramin²**, **L. Penzo¹**, **C. Di Natale²**, **A. Frigato²**, **F. Antico¹**, **A. Giacomini¹**, **N. Arreghini²**, **G. Marchiori²**

¹A-ULS 14 "Chioggia", Dipartimento di Patologia - ²A-ULS 12 "Veneziana", Servizio di Medicina Trasfusionale

Scopo del Lavoro: Nell'ambito di un progetto di collaborazione inter-aziendale abbiamo messo a punto un progetto per la valutazione dell'impatto dei processi di virus inattivazione e di congelamento sulla qualità del plasma fresco congelato mediante dosaggio di alcuni fattori della coagulazione.

Materiali e Metodi: Sono stati dosati con metodo funzionale i seguenti parametri FV, FVII, FVIII, FIX utilizzando una strumentazione completamente automatica Amax 190 plus e reattivi forniti dalla ditta Trinity. Per tutti i fattori il range di normalità era compreso tra il 50% ed il 150%. Sono state esaminate le seguenti unità di plasma: A) 32 U non virus inattivate congelate con metodica ordinaria, B) 43 U virus inattivate con blu di metilene e congelate con metodica ordinaria, C) 29 U non virus inattivate congelate con metodica rapida, D) 29 U virus inattivate con blu di metilene congelate con metodica rapida.

Risultati: Per quanto attiene la concentrazione di FV nel gruppo A era di 60+12 U/dL, nel gruppo B 65+15 U/dL, nel gruppo C era 78+14 U/dL, nel gruppo D 81+19 U/dL. Per quanto attiene la concentrazione di FVII era di 82+14 U/dL nel gruppo A, di 72+14 U/dL nel gruppo B, 91+9 U/dL nel gruppo C, 81+13 U/dL nel gruppo D. Per quanto attiene la concentrazione di FVIII nel gruppo A era 76+12 U/dL, 66+18 U/dL nel gruppo B, 77+13 U/dL nel gruppo C, 71+9 U/dL nel gruppo D. Per quanto attiene la concentrazione di FIX era di 84+4 U/dL nel gruppo A, 70+15 U/dL nel gruppo B, 84+18 U/dL nel gruppo C, 73+7 U/dL nel gruppo D. Tutti i risultati si intendono espresso in % ovvero U/dl come media + 1 DS.

Discussione e Conclusioni: Tecnicamente è possibile effettuare un periodico controllo a campione sul contenuto dei fattori della coagulazione sulle diverse tipologie di plasma prodotto. Tale controllo è possibile mediante la cooperazione tra Servizi di Medicina Trasfusionale e Servizi di Medicina di Laboratorio. La procedura di congelamento rapido migliora in maniera significativa la qualità del plasma prodotto, per quanto attiene il contenuto in fattori della coagulazione, sia per il plasma virus inattivato (da adibire ad uso clinico) che per il plasma non virus inattivato (da inviare al frazionamento). La adozione di congelatori rapidi è quindi assolutamente da prescrivere a tutte i Servizi di Medicina Trasfusionale.

IL LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE NELLA DIAGNOSI DELLE PNEUMOPATIE INFILTRATIVE DIFFUSE**A-25****M. Golato[^], G. de Matthaes*, P. Salutari*[^]**[^] Patologia Clinica *Servizio di Pneumologia, [^]U.O. Medicina Interna, Ospedale "Renzetti", Lanciano

Scopo del lavoro: il lavaggio broncoalveolare (BAL) è una procedura utilizzata in broncoscopia che permette il recupero di componenti cellulari e proteiche a livello alveolare, rappresentative di fenomeni infiammatori e immunitari del cosiddetto "polmone profondo". Il BAL è "diagnostico" solo in un ristretto numero di patologie respiratorie ma la sua applicazione si è estesa in rapporto alle modificazioni epidemiologiche delle pneumopatie interstizio-alveolari sia infettive che immunologiche. Scopo della revisione della casistica è evidenziare come l'utilizzo della citofluorimetria su Bal può contribuire con lo studio delle diverse popolazioni cellulari, alla diagnostica pneumologica anche in pazienti critici e immunocompromessi.

Materiali e Metodi: descriviamo due casi clinici. Il primo: donna di 36 anni ricoverata per marcata dispnea a riposo, tachipnea, tachicardia, cianosi centrale, ipossiemia (pO₂ 41 SatO₂ 78), iperpiressia, con opacità consolidative periferiche polmonari medio-basali bilaterali e broncogramma aereo (Rx torace + HRCT). La sintomatologia era insorta qualche giorno prima del ricovero con andamento ingravescente. Il quadro clinico-radiologico suggeriva come prima diagnosi una broncopneumite bilaterale, gli esami di laboratorio erano indicativi di flogosi acuta, senza segni d'immunocompromissione. La paziente è stata sottoposta a broncoscopia per BAL e biopsia polmonare transbronchiale (TBPB); sul materiale recuperato sono stati eseguiti esami microbiologici, fenotipizzazione linfocitaria, ed esame citomorfologico. Lo studio citofluorimetrico è stato eseguito su strumento Facscalibur(BD) utilizzando gli anticorpi CD3/CD4/CD8/CD19/ CD16-56/CD3 HLADR marcati con Fitc (isotiocianato di fluoresceina) e Pe (ficoeritrina), unitamente alla valutazione morfologica della quota granulocitaria e mono-macrofagica. Esclusa una patologia infettiva, il quadro immunologico citofluorimetrico evidenziava soprattutto una riduzione del rapporto CD4/CD8 orientando per "alveolite linfocitaria", confermata dall'esame morfologico che suggeriva anche la presenza di una bronchiolite obliterante-polmonite organizzativa (BOOP), ben correlata con l'immagine radiologica TAC. La biopsia polmonare chirurgica, successivamente, confermava la diagnosi di alveolite allergica estrinseca con aspetti BOOP-like. Il secondo caso: paziente maschio di 80 anni, affetto da mielodisplasia, ricoverato nel Marzo 2004 per un focolaio broncopneumonico. Dimesso con risoluzione clinica e radiologica dell'addensamento polmonare e nuovamente tornato a ricovero dopo due mesi per la recidiva della sintomatologia clinica (dispnea, febbre, ipersedimetria) e radiologica (nuovo riscontro di consolidamento polmonare). Nell'ipotesi potesse trattarsi di una recidiva del precedente focolaio infettivo, specie per lo stato di immunodepressione, è stato sottoposto a broncoscopia per BAL e biopsie polmonari transbronchiali. Tutti gli esami microbiologici risultavano negativi, mentre la fenotipizzazione linfocitaria sul BAL evidenziava una alveolite linfocitaria con rapporto CD4/CD8 ridotto e lo studio citomorfologico mostrava macrofagi, occasionali eosinofili e plasmacellule; quadro compatibile con BOOP.

Conclusioni: l'applicazione della citofluorimetria insieme all'esame morfologico su BAL è stata utile nel fornire informazioni diagnostiche discriminanti ed indirizzi terapeutici nei casi descritti e ha confermato il suo ruolo nella diagnostica differenziale delle pneumopatie interstizio-alveolari.

ALTERAZIONI DELL'EMOSTASI DURANTE CIRCOLAZIONE EXTRACORPOREA**A-26****R. Facchinetti*, P. Rizzotti*, G. Petrilli^o, F. Miani^o***Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche Osp. Civile Maggiore Verona; ^oIstituto Cardiocirurgia Università Verona

Scopo del lavoro. Valutare l'influenza della circolazione extracorporea (CEC) sui alcuni parametri emostatici. Materiali e metodi. 79 Pazienti in CEC con eparina per intervento di by-pass aortocoronarico. CEC: pompa Roller Stockert S III Dideco, ossigenatore a membrana Dideco D 903 Avant, ipotermia moderata, clampaggio aortico e cardioplegia ematica anterograda e retrograda. Campioni raccolti immediatamente prima e dopo CEC. Dosaggi: AT cromogenica Biopool su CA 7000 Sysmex, complesso T-AT Enzygnost Dade Behring, Capacità emostatica piastrinica PFA Dade Behring, Emoglobina su Sysmex XE-2100, Aptoglobina immunologica, LDH enzimatico. Statistica t di Student per dati appaiati.

Risultati: vedi tabella.

Discussione e conclusioni. L'attivazione del sistema coagulativo è rilevata da aumento di TAT e DD e diminuzione di AT e PLTS. L'aggregabilità piastrinica è diminuita dopo CEC (trattamento eparinico). La perdita ematica media è stata di 700 mL/24h, con infusione media di 1.02 unità di plasma e 2.2 unità di sangue intero. Vi è stata emolisi con aumento LDH e consumo di Aptoglobina. In nessun caso si sono avute gravi sindromi emorragiche o DIC postoperatorie.

Risultati:

Analita	Media Pre CEC	Media Post CEC	Variazione %	p
ANTITROMBINA %	82	56	-32	< 0.005
COMPLESSO T-AT ug/L	12.4	65.3	+427	< 0.005
D-DIMERO mg/L	0.22	1.30	+ 491	< 0.005
PFA: COL/EPI sec.	186	217	+ 17	0.007
PFA: COL/ADP sec.	99	140	+ 41	< 0.005
EMOGLOBINA g/L	120.9	91.2	-25	< 0.005
PIASTRINE x 10 ⁹ /L	199	118	-41	< 0.005
APTOGLOBINA g/L	1.5	0.6	-60	< 0.005
LDH UI/L	126	153	+ 21	0.001

**DETERMINAZIONE DEL F.v.WILLEBRAND Ag:
CONFRONTO FRA DUE METODI DI STUDIO**

A-27

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

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

Scopo del lavoro: Nostro obiettivo era valutare un metodo immunoturbidimetrico automatizzato per la determinazione dell'Ag del F.v.Willebrand (vWF:Ag) confrontandolo con un metodo che utilizza la tecnica ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay).

Materiali e metodi: abbiamo esaminato 20 campioni di plasma congelato provenienti da pazienti studiati per diatesi emorragica o sospetta malattia di v.Willebrand (8) e riscontro di aPTT allungato(12). Il dosaggio del vWF:Ag sui campioni così selezionati è stato eseguito con tecnica ELFA su strumento Vidas (Biomerieux) e con un metodo immunoturbidimetrico (vWFAg-Dade- Behring) automatizzato su coagulometro BCT.

Risultati: Nella tabella 1 vengono illustrati i risultati ottenuti.

Discussione e conclusioni: La correlazione buona su tutta la distribuzione dei valori ottenuti risulta ottima per i risultati patologici bassi (riscontro maggiormente rilevante dal punto di vista clinico). Dal punto di vista laboratoristico i vantaggi del test vWAg-Dade Bhering sono rappresentati da facile automazione, ripetibilità, rapidità di esecuzione (pochi minuti in confronto ai 30-35 della determinazione in ELFA). Inoltre non è richiesto uno strumento dedicato.

Tabella 1. Risultati con i due metodi

campione	Vidas	BCT	campione	Vidas	BCT
1	18	24	11	89	98
2	21	26	12	102	94
3	22	24	13	109	111
4	25	26	14	116	100
5	29	31	15	134	145
6	32	35	16	139	164
7	41	42	17	162	157
8	53	52	18	181	171
9	54	56	19	193	195
10	71	68	20	567	501

L' IMPATTO SULLA RICHIESTA CLINICA DI UNA NUOVA METODICA PER D DIMERO

A-28

A. Pupillo, G. Cambioli, M. Torboli, M. Schinella, P. Iseppi *

Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia; *U.O. Medicina d'Urgenza e Pronto Soccorso, Ospedale di Rovereto, piazzale S. Maria, 38068 Rovereto (TN)

Scopo del lavoro. Numerose condizioni cliniche sono accompagnate da elevati livelli di D dimero e ciò comporta una bassa specificità del test indipendentemente dalla metodica utilizzata; tuttavia per la sua elevata sensibilità risulta utile nella diagnosi di esclusione di malattia tromboembolica. E' stato valutato l'andamento delle richieste di D dimero pervenute presso il nostro Laboratorio negli ultimi cinque anni e l'impatto dell'introduzione di una nuova metodica sulla richiesta clinica.

Materiali e metodi. Dal 1999 al I° trimestre del 2001 l'esecuzione del D dimero è stata effettuata con metodo turbidimetrico al lattice su coagulometro BCS (Dade Behring) in routine ed urgenza, con facilità di esecuzione e contenuti tempi di risposta. Dal maggio 2001 l'esecuzione di tale indagine è stata sostituita con strumentazione VIDAS (Biomerieux) con tecnica Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) con doppio anticorpo monoclonale e rilevamento fluorescente finale, che fornisce i risultati in trentacinque minuti. L'introduzione della nuova metodica è stata preceduta da una adeguata informazione sulle caratteristiche tecniche della metodica e formazione circa le modalità da adottare per la richiesta del D dimero. Tutte le richieste di D dimero pervenute sono state esaminate e suddivise per anno e per richiedente: Pronto Soccorso, urgenze, interni ed esterni.

Risultati. L'analisi dei dati evidenzia il maggior numero di richieste nel corso dell'anno 2000: 3956 richieste rispetto alle 2179 dell'anno precedente. Prendendo in esame i dati del 2001 si osserva un netto decremento delle richieste nei trimestri successivi al primo (1161,817,417 e 500 rispettivamente), riconducibile alla introduzione della nuova metodica (maggio '01). In particolare si può evidenziare un autentico crollo nel numero di richieste da parte del Pronto Soccorso (da 584 nel primo trimestre a 525 nei tre trimestri successivi), seguito da una tendenza simile, anche se in minor misura, degli altri richiedenti. Il trend osservato si è ripetuto nel corso del 2002 con 1864 richieste, mentre nell'anno successivo si è avuto un aumento di circa 500 test.

Conclusioni. Il metodo introdotto, pur se caratterizzato da costi superiori in termini economici e di TAT, ha comportato una netta diminuzione delle richieste di D dimero. Tuttavia l'opera intensa e capillare di sensibilizzazione dei clinici circa l'appropriatezza del test, si è concretizzata in una più attenta e mirata richiesta con sensibile riduzione dell'impegno in termini economici e gestionali. A questa diminuzione si contrappone un maggior grado di soddisfazione da parte dei clinici sottolineata nel corso di vari audit. L'incremento osservato nel corso del 2003 è da ascrivere alla modificazione del protocollo relativo alla valutazione del paziente con dolore toracico. È tuttavia da considerare la possibilità di un incremento della richiesta alla luce di un possibile utilizzo del D dimero nella esclusione di patologia dissecante aortica.

D DIMERO E / O FDP NEL PANNELLO COAGULATIVO DIAGNOSTICO DELLA COAGULAZIONE INTRAVASCOLARE DISSEMINATA (CID)**A-29****R. Irde, M. Angius**

Medicina di Laboratorio, Ospedale San Martino di Oristano

Nella diagnostica della CID i Prodotti di Degradazione della Fibrina (FDP) e il D Dimero (DD) sono considerati test di conferma. Gli FDP provano l'azione della plasmina sulla fibrina e/o sul fibrinogeno, il DD prova l'intervento sia della trombina che della plasmina. L'uso abbinato dei due test era legato ai test semiquantitativi per il DD, più specifici ma meno sensibili dei test per gli FDP. Vi è inoltre la possibilità di una positività isolata degli FDP, indice di una lisi isolata del fibrinogeno. L'introduzione di metodi per il DD più sensibili, quantitativi e automatizzati porta alla necessità di una rivalutazione dell'uso di entrambi nella sospetta CID.

Scopo del Lavoro. La domanda di partenza è se l'esecuzione del test per gli FDP in associazione al test del DD fornisca informazioni aggiuntive.

Materiali e Metodi. Sono state selezionate 198 richieste in singoli pazienti e su 142 è stato valutato anche il valore del PT e aPTT. Il DD è stato dosato con test quantitativo al lattice (IL Coagulation System) (cut off 255 ng/mL), gli FDP con test semiquantitativo al lattice (ROCHE) (cut off 5 µg FDP/mL).

Risultati. Su 198 determinazioni di DD il 6% è risultato negativo e il 94% positivo. Dei 12 test DD negativi, 10 sono risultati FDP negativi, 2 sono risultati FDP positivi (>5 <20). Su 186 risultati DD positivi il 25,3% è risultato FDP negativo (range DD 258 - 1402) e il 74,7% FDP positivo. Su 141 FDP positivi solo l'1,4% è risultato DD negativo. La concordanza dell'informazione è stata del 75,3%, la discordanza del 24,7%. Analizzando DD e FDP in rapporto al risultato del PT e aPTT e suddividendo i dati in due gruppi: il gruppo1 con PT e/o aPTT alterato e il gruppo2 con PT e aPTT normali, abbiamo riscontrato una concordanza del 80,4% nel gruppo1 e 76,7% nel gruppo2 e una discordanza nel 19,6 (gruppo 1) e 23,2% (gruppo 2) rappresentata da un risultato del DD positivo con FDP negativi (19,6 e 22,1) e dallo 0% e 1,2% per un FDP positivo associato ad un DD negativo.

Discussione. Solo una esigua minoranza mostra valori di DD al di sotto del cut off e l'utilizzo di entrambi i test non aiuta a confermare la diagnosi. Un aiuto in termini di esclusione della diagnosi potrebbe venire da una scelta per il DD di un cut off più alto che permetta di aumentarne la specificità. Ad esempio analizzando i valori ottenuti nel gruppo2 si raggiunge una specificità del 70% con un cut off di 1650 ng/mL. La sensibilità a questo cut off nel gruppo1 risulta essere del 52% con una concordanza con gli FDP positivi del 100%.

Conclusioni. Si ribadisce il concetto che la diagnosi di CID può scaturire solo dalla combinazione di elementi clinici e anormalità di laboratorio. La risposta nei test di conferma dovrebbe attentamente tener conto del risultato dei test di screening del Pannello Coagulativo.

DIAGNOSI DI LABORATORIO DEL LUPUS ANTICOAGULANT: DIVERSA SENSIBILITÀ DI ALCUNI TEST DI SCREENING**A-30****L. Simoni, AM. Ottomano, G. Bergonzini, L. Canovi, C. Chiodino, D. Campioli, A. Carbonieri**

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

Scopo del lavoro: Il Lupus anticoagulant (LAC) è un' immunoglobulina, generalmente IgG, IgM e più raramente IgA, che interferisce in vitro con i test di coagulazione fosfolipidi-dipendenti (PT, aPTT, KCT, DRVVT, ecc..). Clinicamente la presenza del LAC si associa ad eventi trombotici, sia venosi che arteriosi, piastrinopenia, complicanze ostetriche, malattie autoimmuni. La finalità del nostro lavoro è stata la valutazione della sensibilità dei test di screening previsti dal protocollo in uso presso il nostro laboratorio per la ricerca del LAC.

Materiali e metodi: Nei primi sette mesi del 2004 presso il nostro laboratorio sono stati valutati 1142 campioni per sospetta presenza di LAC in diverse patologie (malattie autoimmuni, TVP, ictus, patologie ostetriche). Il sangue anticoagulato con citrato di sodio, è stato sottoposto, in momenti operativi diversi, a tre test di screening (aPTT, KCT, DRVVT). L' aPTT (STA-aPTT:Roche) è stato eseguito sul plasma fresco ottenuto dopo centrifugazione a 3000 g per 15'. Il plasma così ottenuto è stato poi filtrato con filtri di 0.22 mm, congelato in azoto liquido e conservato a -80°C. Entro due settimane, dopo scongelamento rapido, sono stati eseguiti KCT (reattivo home-made: caolino 0.5% in soluzione fisiologica) e DRVVT (DVV10: American Diagnostica). I risultati patologici sono stati approfonditi con il mixing test (utilizzando plasma normale avente le stesse caratteristiche dei campioni) e per il DRVVT è stato eseguito il test di conferma (DVV confirm: American Diagnostica).

Risultati: 38 campioni sono risultati positivi per tutti i 3 test di screening; 8 campioni positivi per KCT e DRVVT e negativi per aPTT; 9 positivi per aPTT e KCT e negativi per DRVVT; infine 11 positivi solo per KCT.

Discussione e conclusioni: Si conferma che il risultato dell' aPTT non può essere utilizzato come criterio di selezione nel proseguire o meno la ricerca LAC (avremmo avuto 8 falsi negativi). Il DRVVT si conferma test di buona precisione e facilmente automatizzabile, compreso lo specifico test di conferma. Nella nostra casistica il test più sensibile si è rivelato il KCT, in particolare nelle patologie reumatologico / autoimmuni. La ricerca del LAC rimane una diagnostica complessa che necessita dell'utilizzo di più test di screening in quanto, a causa della eterogeneità degli anticorpi ad attività lupus anticoagulant, non esiste un unico test specifico per la loro rilevazione.

EFFETTI DI UNA NUOVA MEMBRANA DIALITICA (PSN) SUI RECETTORI PIASTRINICI (RPS) GP IB E GP IIB/IIIA

A-31

M. Golato¹, F. Di Luca¹, F. Indino¹, M. Liani², E. Trabassi²

¹ Patologia Clinica O.C. "Renzetti" Lanciano - ² U.O. Nefrologia e Dialisi, O.C. San Massimo, Penne

Scopo del lavoro: verificare la biocompatibilità della membrana PSN, recentemente introdotta, attraverso lo studio dei recettori piastrinici di superficie; durante la terapia emodialitica il sangue entra in contatto con molteplici componenti del circuito extracorporeo, che possono indurre fenomeni di alterata biocompatibilità. Il nostro studio è focalizzato alle interazioni tra membrana dialitica in PSN ed RPS. Com'è noto nell'uremia la riduzione dell'adesività e aggregabilità piastriniche contrasta con l'evidenza clinica di uno stato trombofilico, condizione che può essere evidenziata con i recettori piastrinici: il GP Ib che modula l'adesione delle piastrine alle pareti vascolari interagendo in modo specifico con il fattore von Willebrand ed il GP IIB/IIIA che sovrintende al meccanismo di aggregazione tra piastrine interagendo con il fibrinogeno. Numerosi studi forniscono chiare indicazioni sul coinvolgimento dei RPS nella progressione della vasculopatia aterosclerotica e delle ostruzioni trombotiche; l'alterata espressività di GP Ib e GP IIB/IIIA può essere ritenuta buon marker di danno vascolare.

Materiali e metodi: sono stati reclutati 24 soggetti sani (18 adulti e 6 in età pediatrica) e 40 soggetti in emodialisi (HD) e peritoneodialisi (PD) (14 adulti in HD, 10 adulti in PD, 6 bambini in HD e 10 bambini in PD). Successivamente sono stati selezionati con metodo random 6 emodializzati da sottoporre ad emodialisi con PSN. Sono stati esclusi coloro con assunzione recente di farmaci attivi sulle piastrine o malattie note dell'emostasi. Ad ognuno è stato eseguito un prelievo di sangue venoso in sodio citrato; a quelli trattati con filtro PSN i prelievi sono stati ripetuti, prima della seduta emodialitica, dopo 15 giorni dall'inizio e dopo 30 giorni e a 30 e 60 giorni dalla fine dello studio. I recettori GP Ib e GP IIB/IIIA sono stati studiati con anticorpi monoclonali 42b e 41a marcati con FITC (Immunotech), con lettura su citofluorimetro Facscalibur (BD), valutando il valore medio di fluorescenza e la percentuale di piastrine. L'analisi statistica sui risultati è stata eseguita con il test t di Student.

Risultati: dal confronto tra le medie risulta che non vi è differenza statisticamente significativa per il GP Ib in nefropatici adulti e pediatrici rispetto ai controlli, mentre emerge una differenza statisticamente significativa tra HD adulti ed HD pediatrici ($P < 0.005$) ma non tra PD adulti e PD pediatrici ($P = n.s.$). Il GP IIB/IIIA risulta aumentato nei pazienti adulti e pediatrici in HD rispetto ai sani (Adulti $P < 0.01$; Pediatrici $P < 0.01$) e normale nei pazienti in PD.

Conclusioni: tecniche dialitiche differenti come la HD e la PD hanno un impatto diverso sui recettori. In particolare nel caso di PD vi è normalizzazione dell'espressività del GP IIB/IIIA mentre negli HD tali valori rimangono elevati sia negli uremici adulti ($P < 0.01$) che nei pediatrici ($P < 0.01$). I nostri dati confermano l'ipotesi che la depurazione artificiale può influenzare l'emostasi e nel caso del GP IIB/IIIA produrre effetti clinici con minore o maggiore tendenza trombofilica ed aterogenica nei nefropazienti. La membrana dialitica PSN mostra un buon grado depurativo con ripercussioni a breve termine su alcuni esami di laboratorio. I risultati ottenuti dimostrano tuttavia, quanto già evidenziato da diversi studi, che tecniche dialitiche e materiali differenti possono influenzare in modo diverso i meccanismi biologici

RUOLO ATTUALE DEL LABORATORIO NELLA SCLEROSI MULTIPLA

A-32

MG. Scarmozzino, A. Dardano, R. Ienco, V. Fuduli

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

Scopo del Lavoro. Molte malattie neurologiche riconoscono nella loro patogenesi meccanismi immunitari e, quindi, necessitano di indagini di laboratorio appropriate, tali da consentire una precisa diagnosi ed un'attenta prognosi. La valutazione della regolazione della risposta immunitaria e della fase acuta di malattia sono tra i criteri valutativi più moderni per la implementazione di linee guida diagnostiche e prognostiche. In questo studio, svolto nell'ambito di un progetto più ampio, presentiamo i dati ottenuti dai dosaggi di TNF-alfa nel liquor e di IL-6, IL-2, sIL-2R, IL-10 e TNF-alfa nel siero di soggetti con sintomatologia di esclusiva pertinenza neurologica.

Materiali e Metodi. Nell'ultimo semestre sono stati arruolati 70 pazienti in prima diagnosi, di entrambi i sessi, di età compresa tra i 14 e 85 anni. Tutti i pazienti sono stati sottoposti, prima dell'inizio di terapie specifiche, contestualmente a prelievo di sangue e liquor. Le aliquote dei campioni sono state conservate a -80°C fino all'esecuzione dei dosaggi. Le citochine sono state dosate nel liquor e nel siero con metodiche ELISA (R&D Systems) adottando i seguenti cut-off di riferimento: 50pg/ml per TNF-alfa, 3pg/ml per IL-6, 60pg/ml per IL-2, 140pg/ml per sIL-2R, 5pg/ml per IL-10.

Risultati. La diagnosi clinica e strumentale dei pazienti inclusi nello studio è stata la seguente: 25, di età compresa tra 14 e 45 anni, Sclerosi multipla; 31, Cefalea; 2, M di Parkinson; 2, SLA; 3, Vasculopatia cerebrale; 3, Mieloradicolite; 4, Malattia del Motoneurone. Tutti i pazienti affetti da SM hanno presentato valori superiori al cut-off nei dosaggi di TNF-alfa su siero e 10 di loro anche in quelli su liquor; valori elevati sIL-2R, in alcuni casi fino ad 8 volte il limite di riferimento e, contestualmente, valori IL-2 inferiori a quelli di riferimento. Elevati livelli sierici di IL-6 sono stati riscontrati in tutti i pazienti che presentavano evidenti segni di fase acuta di malattia ed alterazione della barriera ematoencefalica.

Discussione e Conclusioni. Nella patogenesi della SM riveste grande importanza l'alterazione della risposta cellulo-mediata, con un prevalente "field" di tipo Th1. Il dosaggio nel siero delle citochine proinfiammatorie, in particolare IL-6, è appropriato per la valutazione di fase acuta e di progressione della malattia. Il dosaggio sierico di IL-2 ed IL-2R può dare un'indicazione precisa della attivazione del sistema immunitario anche nel corso di differenti malattie neurologiche. Eventuali incrementi stabili e significativi di IL-10 indicano un corretto effetto immunomodulante della terapia ed una evoluzione più lenta della SM.

IL CITOFLUORIMETRO TOA-SYSMEX UF 100: POSSIBILE IMPIEGO NELLO STUDIO DEL LIQUIDO CEFALO-RACHIDIANO

A-33

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

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

Scopo del lavoro: Sempre più spesso vengono richieste al laboratorio informazioni quantitative e qualitative sulla composizione cellulare di diversi liquidi biologici: liquido cefalo-rachidiano (LCR), paracentesi, liquidi di dialisi peritoneale, liquido sinoviale, ecc...Gran parte di queste procedure richiedono tutt'oggi metodiche basate sull'uso del microscopio ottico(MO). Se si considera che molte di queste indagini vengono richieste in regime di urgenza e che i risultati hanno importanti conseguenze cliniche, si capisce come in laboratorio si avverta l'esigenza di disporre di metodi che garantiscano il massimo di affidabilità, rapidità, standardizzazione e rintracciabilità. Per questi motivi si è sviluppato un grande interesse sul possibile utilizzo di strumentazione automatizzata idonea. Scopo del nostro lavoro è stato di valutare il possibile impiego di un citofluorimetro dedicato allo studio della componente corpuscolata delle urine (TOA-SYSMEX UF100), per lo studio citometrico di altri liquidi biologici ed in particolare di LCR, in cui sia importante ricercare e quantificare l'eventuale componente cellulare, il numero di leucociti e possibilmente la loro natura granulocitaria o linfocitaria.

Materiale e metodi: abbiamo esaminato sull'UF 100 quattro campioni di LCR giunti al nostro laboratorio di urgenza per sospetti diagnostici di meningite acuta, confrontandoli con i risultati dei metodi in uso presso il nostro laboratorio: conteggio dei GB al MO con camera contaglobuli di Nageotte ed osservazione morfologica del sedimento con vetrini precolorati (Testsimplers-Waldeck)

Risultati e discussione: I risultati ottenuti sull'UF 100 e con il MO mostrano una buona confrontabilità per quanto riguarda il conteggio dei leucociti. L'ispezione visiva dei grafici fornisce inoltre importanti informazioni per l'interpretazione dei risultati consentendo di ipotizzare la natura granulocitaria o linfocitaria della componente corpuscolata in base alla disposizione dei cluster (maggiori valori di Forward scatter e Fluorescenza per i granulociti) e degli istogrammi (picco al di sopra del canale 100 per i granulociti, al di sotto per i linfociti).

Discussione e Conclusioni: La tecnologia valutata mostra a nostro parere grande interesse per lo studio citometrico del LCR e può rappresentare un utile supporto (affianca ma non sostituisce le metodologie analitiche attualmente in uso) per la diagnostica liquorale fornendo conteggi accurati e precisi anche a basse concentrazioni cellulari e indicazioni sulla composizione della parte corpuscolata eventualmente presente mediante l'ispezione visiva dei grafici prodotti.

MULTIPLE SCLEROSIS AND COELIAC DISEASE: IS THERE AN INCREASED RISK?

A-34

A. Barassi¹, S. Finazzi², S. Salvatore³, M. Lotzniker², G.V. Melzi d'Eril¹

¹DSBSC, Università dell'Insubria, Varese. ²Laboratorio di Analisi, Ospedale di Legnano, Milano. ³Clinica Pediatrica, Università dell'Insubria, Varese

Introduction and aim. Multiple sclerosis (MS) and coeliac disease are both considered immune-mediated diseases with possible neurological and gastrointestinal involvements. The absence of classical symptoms of coeliac disease does not exclude the presence of the disease. In the last years, improved serological screening methods, such as trasglutaminase antibodies, have provided a higher prevalence of coeliac disease in worldwide population. The aim of this study was the determination of the prevalence of celiac disease in an unselected group of patients with multiple sclerosis.

Materials and methods. We recruited 95 consecutive adult patients (mean age 41.3 years, range 21-63 years) with MS (76 with relapsing and remitting, 19 with primary/secondary progressive MS) from the MS outpatient clinic for clinical follow-up. Forty-six patients (48.4%) were under treatment with recombinant IFN- γ 1-b. Serum IgA recombinant anti-human trasglutaminase (tTG) concentrations were determined in all subjects (Eu-tTG IgA umana, Eurospital). The intra-assay CV for the IgA human-tTG autoantibody ELISA was 2.2% (n=30), and the inter-assay CV was 5.8% (n=30). We considered as pathological the values >7 UA/mL. Total serum IgA were also measured by immunoturbidimetric assay (Tina-Quant IgA, Roche) on the Hitachi 917 in all the patients. Serum levels below 0.04 g/L revealed selective IgA deficiency. No patients revealed gastrointestinal symptoms or any gastrointestinal disease.

Results and conclusions. All patients presented normal values of tTG and total serum IgA. Levels of tTG did not show any significant correlation with MS staging, duration or severity. Patients treated with IFN presented upper levels of mean tTG compared to non IFN-treated patients (2.22 UA/ml vs 1.69 UA/ml) but without significant difference (p = 0.25). We could not demonstrate an increased prevalence of celiac disease in our group of patients with multiple sclerosis. Different cytokine profile and HLA pattern between the two diseases may represent crucial insights to explain our results (1-4).

References. 1) Ochi H, Osoegawa M, Wu XM et al. J Neurol Sci 2002 Sep 15;201(1-2):45-51. 2) Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M et al. Gut 2002;50(2):186-90. 3) Barcellos LF, Okseberg JR, Begovich AB. Am J Human Genet 2003;72(3):710-6. 4) Ludwig MS, Thorsby E. Gastroenterology 1993;105:910-922.

BANDE OLIGOCLONALI IGG NEL LIQUOR. DUE METODI A CONFRONTO**A-35****P. Li Vigni, V. Cantisano, S. La Chiusa, I. Brusca**

Unità Operativa Complessa di Patologia Clinica, Ospedale Buccheri La Ferla FBF, Palermo

Scopo del lavoro. La ricerca delle bande oligoclonali IgG è importante, nella diagnostica liquorale, soprattutto in patologie del SNC di natura infiammatoria. La discriminante di Reiber, correlando i dati di Albumina ed IgG, sieriche e liquorali, permette di differenziare rispetto alla protidorrachia totale la quota proteica di sintesi intratecale. Scopo del nostro lavoro è confrontare il dato matematico con il risultato ottenuto tramite isoelettrofocalizzazione delle IgG.

Materiali e metodi. Albumina e IgG, sieriche e liquorali, sono state dosate in nefelometria (BNII, Dade Behring) e la discriminante di Reiber è stata calcolata dal software Protis (Dade Behring). L'isoelettrofocalizzazione è stata eseguita con il Kit IgG-IEF della Helena Laboratories con doppio anticorpo.

Risultati. Sono stati processati 50 campioni ottenendo i seguenti risultati (vedi tabella).

Pazienti	IgG IEF	Reiber
29 (58%)	negativi	negativi
13 (26%)	positivi	positivi
3 (6%)	positivi	negativi
5 (10%)	negativi	positivi

I risultati ottenuti con il metodo IEF sono stati confermati nel 95 % dei casi dalla RMN. Il coefficiente di concordanza di Kendall tra IEG-IgG e discriminante di Reiber è risultato essere $w = 0.81$ ($p < 0.0001$).

Conclusioni. I due test mostrano una ottima concordanza, ma l'IEF-IgG dimostra essere il metodo di laboratorio migliore per la ricerca delle bande oligoclonali IgG.

Bibliografia. 1) Bernardi G., Corsini E., Ciusani E.-L'interpretazione quantitativa dei dati liquorali-Riv.Med. Lab., 2002. 2) Reiber H., Felgenhauer K.-Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system-Clin Chem Acta 1987; 3) Andersson M., Alvarez-Cermeno J., Bernardi G. et al.-Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. J. Neurol. 1994; 4) Franciotta D., Lolli F.-Linee guida per le analisi di base del liquor Riv.Med. Lab., 2002. 5) S. Ohman, J. Ernerudh, P. Forsberg, A. Henriksson, H. von Schenck, M. Vrethem-Comperison of seven formulae and isoelectrofocusing for determination of intrathecally produced IgG in neurological diseases-Ann Clin Biochem 1992; 6) Uldry P.A., Steck A.J., Regli F.-Oligoclonal aspects of IgG of the CSF. Methods of analysis and clinical correlations - Schweiz Med Wochenschr 1998.

**MISURAZIONE AUTOMATIZZATA SU ADVIA 1650 (Bayer)
DELLA XANTOCROMIA SU LIQUIDO CEREBRO-SPINALE****A-36****B. Bardone, A. Appiani, D. Scarano, MG. Sulas, P. Zumaglini, L. Kurilko, C. Musitelli, G. Bellomo**

Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche, Università del Piemonte Orientale, ASO Maggiore della Carità, Novara e Bayer Diagnostics SRL, Milano

Un liquido cerebro-spinale (LCS) xantocromico può assumere un colorito rosa, arancio o giallo in rapporto alla lisi di eritrociti ed al metabolismo dell'emoglobina (Hb) rilasciata dalla lisi.

Scopo della ricerca: Lo studio si prefigge lo scopo di sviluppare una metodica semplice, ripetibile ed automatizzata per la misurazione della xantocromia su LCS.

Materiali e Metodi: ADVIA-1650 (Bayer) esegue letture contemporanee di un campione a 14 differenti lunghezze d'onda. Hb presenta tre picchi di assorbenza: a 571 nm, a 478 nm ed in misura trascurabile a 658 nm. La bilirubina (BIL) ha un picco di assorbenza a 451 - 478 nm, ma non assorbe in modo significativo a 571 nm e a 658 nm. Sono state utilizzate queste differenti combinazioni di lunghezze d'onda ed opportuni fattori di correzione per impostare una lettura spettrofotometrica di campioni di LCS per la misurazione dei colori rosso (xantocromia rossa, XR) e giallo (xantocromia gialla, XG). I risultati sono stati espressi in Unità Arbitrarie (UA).

Risultati: Sono state costruite curve di calibrazione utilizzando LCS normale, limpido e addizionato di concentrazioni crescenti di BIL e/o di Hb. Sia nel caso della BIL che dell'Hb, i risultati hanno evidenziato una ottima correlazione concentrazione/lettura ($R=0.997$ per la bilirubina e $R=0.998$ per l'emoglobina), con intercetta passante per zero, per concentrazioni di entrambi gli analiti comprese fra 0.1 e 3 mg/dL. I limiti di sensibilità individuati per i metodi indagati sono stati di 0.05 mg/dL nel caso della BIL e 0.025 mg/dL nel caso dell'Hb. E' stata evidenziata una interferenza significativa legata alla presenza di proteine plasmatiche per concentrazioni superiori a 500 mg/dL. L'interferenza dell'Hb sulla valutazione della XG è risultata apprezzabile solo per concentrazioni di Hb superiori a 1 mg/dL. AL contrario, l'interferenza della BIL sulla XR è risultata trascurabile. I coefficienti di variabilità (CV) intraassay ed interassay calcolati sono stati: 3.9 % per XG intrassay, 5.1% per XG interassay, 7.02% per XR intrassay e 6.9 % per XR interassay. L'analisi di 30 LCS normali ha evidenziato valori di XG invariabilmente inferiori a 0.1 UAXG e di XA invariabilmente inferiori a 1 UAXR. L'analisi di 16 LCS patologici condotta con il metodo qui descritto e comparato con una analisi visiva condotta da quattro operatori indipendenti ha evidenziato una correlazione perfetta.

Conclusioni: I risultati ottenuti suggeriscono come sia possibile utilizzare una metodica spettrofotometrica implementabile su strumentazione automatizzata di chimica-clinica per la valutazione della xantocromia del liquido cerebro-spinale.