

BIOMARCATORI PLASMATICI DI STRESS OSSIDATIVO IN ATLETI DURANTE ESERCIZIO FISICO

B-01

MM. Corsi*, D. Passoni*, L. Coppo*, R. Verna°, A. Dolci^, F. Banfi'

*Istituto di Patologia Generale, Laboratorio di Patologia Clinica, Università di Milano; °Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università di Roma La Sapienza; ^Dipartimento di Patologia, Multimedica, Sesto San Giovanni, Milano; 'Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano

Scopo del Lavoro. L'esercizio fisico è caratterizzato da un incremento del consumo di ossigeno da parte di tutto il corpo ed in particolare dai muscoli. Questo incremento è associato ad un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno; inoltre lo stato di difesa antiossidante è regolato dallo stato di allenamento fisico. Atleti che seguono un regolare allenamento fisico con una dieta regolata e ricca di antiossidanti, possono avere aumentato il loro stato di difesa antiossidante e moderati livelli di specie reattive dell'ossigeno. È per questo motivo che abbiamo voluto indagare altri biomarcatori dello stress indotto dall'esercizio fisico quali le heat shock protein 70 e l'ossido nitrico.

Materiali e Metodi. Abbiamo studiato 44 giocatori professionisti di pallone, e 15 volontari sani, uguali per sesso ed età. Abbiamo dosato mediante metodiche immunoenzimatiche le proteine da shock termico (Hsp 70) (Stressgen, Victoria, BC, Canada) e metodiche spettrofotometriche l'ossido nitrico (Oxis International Inc., Portland, OR, Usa).

Risultati. Dai nostri studi appare un chiaro ed evidente aumento statisticamente significativo di questi due biomarcatori negli sportivi rispetto ai controlli ($p < 0.0001$) (Mann-Whitney e Turkey-Kramer test). I valori di Hsp70 sono espressi come ng/mL e di ossido nitrico come microM.

Discussione e Conclusioni. Le Hsp70 risultano essere dei biomarcatori dello stress ossidativo indotto dall'esercizio fisico. Molti eventi fisopatologici che vengono a crearsi durante lo stress fisico inducono un aumento nella produzione di Hsp70; tuttavia non si conosce ancora il motivo del rilascio nel circolo periferico di tali molecole. Noi supponiamo che le Hsp70 possano essere un marker indiretto di risposta allo stress ossidativo indotto dall'esercizio fisico. Inoltre l'aumento di ossido nitrico plasmatico è in linea con i dati in letteratura, dove tale aumento è una risposta conseguente allo stress ossidativo, avendo inoltre anche un effetto antiossidante.

La ricerca di tali biomarcatori plasmatici di danno da stress fisico, potrebbe farci comprendere meglio le relazioni esistenti tra bilancia ossidativa ed esercizio fisico, quando risulta difficile dosare i normali indicatori di stress ossidativo, quali specie reattive dell'ossigeno e stato antiossidante.

ESPRESSIONE DEL CD81 SU LINFOCITI DEL SANGUE PERIFERICO IN SOGGETTI CON INFEZIONE DA HCV

B-02

P. Cordiali-Fei, L. Nosotti, F. Pimpinelli, A. Trento, G. Prignano, D. Griso, L. Toma, G. Franco, A. Morrone

Istituto San Gallicano (IRCCS), Roma

Scopo del lavoro. Il virus dell'epatite C (HCV) rappresenta una minaccia crescente per la salute pubblica, con circa 170-200 milioni di persone colpite dall'infezione in tutto il mondo. La velocità della progressione della malattia è altamente variabile e i fattori che incidono sulla prognosi e sulla risposta al trattamento non sono ancora perfettamente compresi. La molecola CD81 è una proteina transmembranaria largamente espressa sulla membrana di diversi tipi cellulari di origine ematopoietica, neuroectodermica e mesenchimale. Il CD81 si lega alla proteina di superficie virale E2 ed agisce pertanto come cofattore per l'entrata del virus HCV negli epatociti. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che il legame CD81-E2 ha una funzione di stimolazione su alcune sottopopolazioni linfocitarie. Scopo del presente studio è di analizzare le possibili differenze nell'espressione del CD81 sulla membrana dei linfociti del sangue periferico in pazienti con infezione da HCV e in diversi gruppi di soggetti, al fine di cercare di comprendere meglio il possibile ruolo immunomodulatore del CD81.

Materiali e metodi. Sono stati inclusi nello studio 64 soggetti (41 maschi e 23 femmine): si tratta di 19 controlli sani, 10 pazienti con epatite cronica da HCV, 12 pazienti con infezione da HIV, 4 pazienti con Porfiria cutanea tarda (PCT), 9 pazienti con coinfezione HCV-HIV, 4 pazienti con coinfezione HCV-HIV + PCT e 6 pazienti con associazione infezione da HCV + PCT.

Risultati. I risultati ottenuti hanno evidenziato un incremento significativo, rispetto al gruppo di controllo, della espressione di CD81 sulla membrana dei linfociti periferici in tutte le condizioni considerate (infezione da HIV, infezione da HCV, PCT, co-infezione HIV-HCV, infezione da HCV + PCT, co-infezione HIV-HCV + PCT). L'aumento della espressione di CD81 in corso di infezione da HCV sulla membrana dei linfociti periferici sembra essere dovuto soprattutto all'incremento significativo di espressione sui linfociti T (CD3+), ma in minore misura anche sui linfociti B (CD 19+).

Discussione e conclusioni. Poiché il danno epatico associato alla infezione da HCV sembra essere primariamente dovuto alla massiva infiltrazione di linfociti proinfiammatori attivati, questi dati suggeriscono la possibilità che l'interazione CD81-E2 abbia un ruolo nell'infiammazione e nella patologia tessutale epatica mediata dai linfociti T. Il CD81 potrebbe quindi modulare la progressione della malattia epatica HCV correlata intervenendo sulla risposta immunitaria dell'ospite, piuttosto che funzionando come recettore per il virus HCV.

AUTOANTICORPI ANTI-C1Q NELLA NEFRITE LUPICA: PREVALENZA E SIGNIFICATO CLINICO

B-03

R.A. Sinico, B. Bollini, L. Di Toma, E. Sabadini, A. Radice

Divisione di Nefrologia e Immunologia, Ospedale S. Carlo, Milano, Italia

Gli anticorpi anti-C1q sono stati recentemente proposti come utili markers nel lupus eritematoso sistemico (LES) poiché la loro presenza sembrerebbe correlare con l'impegno renale. *Scopo del lavoro.* Valutare la prevalenza di anticorpi anti-C1q in pazienti con LES, con e senza coinvolgimento renale, e correlare la loro presenza e titolo con l'attività di malattia/nefropatia. *Materiali e metodi.* Sono stati studiati 60 pazienti con LES, di cui 39 con nefrite lupica, 29 pazienti affetti da altre connettiviti e 53 controlli sani. Inoltre, 18 pazienti con nefrite lupica sono stati ripetutamente valutati durante il decorso della malattia. Gli anticorpi anti-C1q sono stati misurati utilizzando un metodo ELISA messo a punto in laboratorio.

Risultati. Titoli elevati di anticorpi anti-C1q (>55UA) erano presenti in 25/60 pz con LES (42%), nello 0% dei controlli sani e nel 7% dei controlli patologici. Anticorpi anti-C1q erano rilevati nel 54% dei pazienti con nefrite lupica ma soltanto nel 19% di quelli con Lupus senza nefropatia. I pazienti positivi per anti-C1q avevano inoltre valori mediamente più elevati di ECLAM (indice di attività della malattia lupica) (4.35 vs 2.2). Livelli elevati di anti-C1q erano dimostrati nell'89% dei pazienti con nefrite lupica attiva contro lo 0% dei pazienti con nefrite inattiva. Anti-C1q e anti-dsDNA concordavano nel 79% dei casi.

Discussione e Conclusioni. I nostri risultati confermano che gli anticorpi anti-C1q sono presenti in una percentuale significativa di pazienti affetti da LES, che la loro presenza e il loro titolo correlano con l'attività globale della malattia e con la nefropatia in particolare.

ANTICORPI ANTI-MEMBRANA BASALE GLOMERULARE (GBM) NELLA DIAGNOSI DELLA SINDROME DI GOODPASTURE: CONFRONTO TRA DIVERSI METODI

B-04

A. Radice, C. Corace, B. Bollini e RA Sinico

Nefrologia e Immunologia, Osp. S. Carlo, Milano

L'importanza degli anticorpi anti-GBM nella patogenesi della sindrome di Goodpasture è ben nota. La malattia, se non riconosciuta e trattata tempestivamente, può avere decorso fulminante. Poiché l'identificazione precoce dei pz affetti ha implicazioni importanti per il trattamento e la prognosi, è necessario disporre di un test diagnostico per la ricerca di anti-GBM circolanti di elevate sensibilità e specificità. Sono disponibili numerosi kit ELISA che utilizzano diversi substrati antigenici in fase solida ma mancano studi che ne confrontino le "performances".

Scopo del lavoro. Valutare la performance di 4 test per il dosaggio di anti-GBM.

Materiali e metodi. Sono stati studiati retrospettivamente 32 sieri di 18 pz con GPS, 32 contr. patol. e 28 sani, il cut-off è stato scelto mediante analisi delle curve ROC.

Le caratteristiche dei test anti-GBM e i risultati sono riassunti in tabella (sens/spec vs contr.patol.).

Risultati. Tutti i test hanno mostrato una buona sensibilità mentre la specificità variava considerevolmente. Il test fluoroimmunoenzimatico con Ag ricombinante mostrava la miglior performance.

Discussione e Conclusioni. Tutti i test mostrano una buona performance ed alta sensibilità, anche se la specificità può variare considerevolmente.

assay antigen	VA (ELISA) (hr- α 3 chain)	Elia (fluor.) (hr- α 3 chain)	ED (ELISA) (M2 α 3 chain)	DS (ELISA) (α 3 chain)
sensitivity	94.4%	94.4%	94.4%	100.0%
specificity	93.8%	100.0%	96.9%	90.6%

UN NUOVO APPROCCIO AL TEST DI EMBRIOTOSSICITÀ NELLA VALUTAZIONE DI DISORDINI RIPRODUTTIVI

B-05

V. Dolo*, R. Tennina*, M. Baldi§, D. Caserta #, A Pavan*

*Dipartimento di Medicina Sperimentale-Cattedra di Patologia Clinica, #Centro di Procreazione Umana Medicalmente Assistita, Università di L'Aquila, § Consultorio di Genetica SRL, Roma

Scopo del lavoro. Gli eventi abortivi ricorrenti, spesso, sono dovuti alla presenza di "fattori embriotossici" presenti nel siero materno. Negli ultimi anni al fine di migliorare il tasso di gravidanze a termine, sono stati elaborati protocolli diagnostici immunologici per identificare il potenziale fattore tossico. Il test di embriotossicità (Mouse Embryo Assay), si colloca fra i test che nel tempo sono stati utilizzati nel trattamento della sindrome da aborto ripetuto.

Materiali e Metodi. Attualmente il test di embriotossicità in diagnostica è realizzato seguendo due metodi distinti: pre-implantation mouse embryo assay, dove embrioni di topo allo stadio di 2/4 cellule sono coltivati con siero test per 72 h fino al raggiungimento dello stadio di blastocisti valutando parametri come segmentazione, dimensioni, vitalità, compattazione morula, cavità blastocisti; e peri-implantation mouse embryo assay, realizzato con embrioni di topo già allo stadio di blastocisti e seguiti per 72 h valutando parametri come dimensioni, "hatching", adesione e "spreading". Le procedure sperimentali sono condotte realizzando il test in triplicato ed in presenza di siero controllo come siero di donna certamente fertile o siero fetale bovino. Durante i 5 giorni di coltura, l'eventuale effetto embriotossico è valutato sulla base di una mancata crescita delle cellule embrionali rispetto alle colture di controllo.

Risultati. Sulla base di considerazioni tecniche ci siamo indirizzati alla messa a punto di un test che riunisse le due modalità, poiché i due test separati danno, a nostro avviso, un risultato parziale. Il test che noi proponiamo di effettuare, chiamato En bloc Mouse Embryo Assay, è quello di prelevare embrioni di topo allo stadio di 2/4 cellule e coltivarli per 5 gg (120 h) fino all'outgrowth della blastocisti in presenza di siero ottenuto dalla paziente in esame. In tal modo, si può fare una valutazione diagnostica più completa permettendoci di stabilire il momento dello sviluppo embrionale in cui l'effetto tossico si rivela. Abbiamo riscontrato infatti che l'effetto tossico può manifestarsi in stadi diversi durante lo sviluppo, come embrioni che non riescono a segmentare normalmente, embrioni che non formano delle normali blastocisti, embrioni che non riescono a fare l'hatching ed ancora embrioni che non riescono ad aderire al substrato.

Discussione e Conclusioni. Sulla base dei risultati ottenuti concludiamo che il saggio da noi proposto ci consente di individuare lo stadio esatto dello sviluppo embrionale in cui si manifesta l'effetto embriotossico, questo ci permette inoltre di attuare protocolli terapeutici mirati per ogni singola paziente.

ANTICORPI ANTI T-TG COME TEST DI SCREENING NELLA DIAGNOSTICA DI LABORATORIO DEL MORBO CELIACO

B-06

C. Donnini, G. Polverini*, G. Fiaschi*, E. Cammelli*, S. Balsimelli*

Laboratorio analisi Osp. S.Maria alla Gruccia USL 8 Arezzo, *Laboratorio Immunologia Osp. S. Giovanni di Dio Firenze

Scopo del Lavoro. Lo scopo di questa indagine è valutare se la determinazione di anticorpi anti-tTG è utilizzabile come test di screening per la diagnostica di MC, nella casistica di campioni pervenuti al laboratorio di Immunologia della ASF.

Materiali e Metodi. Sono stati raccolti i dati relativi ai dosaggi di anticorpi anti t-TG, EMA e AGA IgA e AGA IgG, di 3250 pazienti, affluiti al Laboratorio di Immunologia e Allergologia del Nuovo Ospedale S. Giovanni di Dio dal gennaio 2002 al dicembre 2003. I Test diagnostici utilizzati per questo studio sono quelli utilizzati di routine: AGA di classe IgA e IgG (EUROSPITAL "a-Gliatest IgA" ed "a-Gliatest IgG"); EMA (EUROSPITAL "Antiendomysium 100"); anti-tTG (EUROSPITAL "Eu-tTg IgA Umana").

Risultati: Su 3250 campioni esaminati: 3000 sono risultati negativi per anticorpi anti t-TG; 53 sono risultati borderline; 197 sono risultati positivi. Esiste una buona concordanza tra i test EMA e anti-tTG (0.9711), che diventa assoluta se si considerano solo i risultati positivi EMA sui corrispondenti risultati anti-tTG. Il dato di maggior rilievo è rappresentato dal valore predittivo negativo (100%) del test anti t-TG nei confronti del test EMA, considerato come test di riferimento. Sono stati valutati anche i risultati di 20 pazienti, pervenuti nel biennio 2002-2003, sottoposti a biopsia gastro-duodenale. Questi pazienti sono stati testati per anti-tTG, EMA sierici, ed EMA-biopsy. Anche in questo caso, la concordanza tra test positivi EMA biopsy e i corrispondenti test anti-tTG è 100%.

Discussione e Conclusioni: I dati relativi a sensibilità e valore predittivo negativo ottenuto sul nostro campione, confermano la possibilità di un utilizzo efficace e sicuro del test anti-tTG come test di screening. Per le sue caratteristiche il test di ricerca anticorpi anti-tTG potrebbe oggi sicuramente sostituire gli attuali test in uso. Per la popolazione non appartenente a categorie a rischio e con valori di IgA nella norma è proponibile un algoritmo diagnostico che potrebbe essere il seguente: esecuzione del test anti-tTG IgA come test di screening, riservando ai soli positivi l'approfondimento diagnostico tramite test EMA e successivamente tipizzazione HLA per gli alleli DQ2 e DQ8 o biopsia. Seguendo questo algoritmo, nei 3250 casi analizzati in questo studio, non sarebbe andato perso nessun risultato positivo per EMA e si sarebbe risparmiata l'esecuzione dei test AGA IgA e AGA IgG che ai fini della interpretazione del risultato diagnostico sarebbero stati inutili. I 250 risultati positivi per il test anti t-TG sarebbero stati ulteriormente saggiati con test EMA, consentendo di giungere correttamente alla conclusione diagnostica.

LINFOCITI T REGOLATORI CD4+CD25+ IN VARIE MALATTIE AUTOIMMUNI**B-07****G. Lobreglio, R. Torsello, P. Pensa**

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

Scopo del lavoro. I linfociti T CD4+ che esprimono la catena alfa del recettore dell'interleuchina 2 (IL-2 R; CD 25) ad alta densità sulla membrana cellulare svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della tolleranza immunologica, mediante la soppressione della proliferazione e delle funzioni effettrici dei linfociti autoreattivi. Questo studio si propone di misurare la percentuale di linfociti CD4+CD25+ e valutare l'intensità di espressione di IL-2R sulla membrana cellulare in pazienti affetti da varie malattie autoimmuni, per stabilire se la riduzione di linfociti T con funzioni regolatorie possa favorire l'insorgenza di processi autoimmuni.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 75 pazienti: 34 affetti da porpora trombocitopenica autoimmune, 5 da anemia emolitica autoimmune, 13 da LES, 11 da artrite reumatoide, 9 da malattie bollose cutanee (pemfigo e pemfigoide bolloso), e 70 soggetti normali di controllo paragonabili per sesso ed età. La determinazione della percentuale dei linfociti T CD4+CD25+ e dell'intensità di espressione del CD25 (valutata come canale medio di fluorescenza) è stata eseguita in citofluorimetria a flusso (FACSCALIBUR, Becton Dickinson) con anticorpi monoclonali in tripla marcatura (CD3 PerCP, CD4 FITC, CD25 PE) su sangue intero lisato. I dati sono stati acquisiti ed analizzati con il software CellQuest.

Risultati. La percentuale di linfociti T CD4+CD25+ è risultata significativamente più bassa nei pazienti (5 %) rispetto ai controlli (16 %), $p < 0.001$; non sono state osservate variazioni significative dell'intensità di espressione del CD25 sulla membrana cellulare.

Discussione e conclusioni. Nei pazienti affetti da varie patologie autoimmuni è evidenziabile una significativa riduzione dei linfociti T regolatori CD4+CD25+ che può contribuire alla alterazione della risposta immune alla base di queste condizioni e costituire un possibile target terapeutico.

ANTICORPI ANTI-PROTEINE P RIBOSOMIALI IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE AUTOIMMUNI SISTEMICHE**B-08****G. Morozzi, S. Cucini, MR. Bacarelli, G. Pucci, A. Simpatico**

Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Sezione di Reumatologia, Università di Siena

Scopo dello Studio: Valutare la prevalenza, la specificità e le associazioni con gli anticorpi anti-cardiolipina (aCL) degli anticorpi anti-proteine P ribosomiali (anti-P) in pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche.

Pazienti e Metodi: per lo studio sono stati arruolati 80 pazienti: 20 affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) senza manifestazioni neuropsichiatriche (NP), 15 con sindrome primitiva da antifosfolipidi (pAPS), 15 con sindrome primitiva di Sjogren (pSS), 15 con sclerosi sistemica (SSc), 15 con artrite reumatoide (AR); tutti i pazienti arruolati soddisfacevano ai criteri di classificazione internazionali per le rispettive patologie; sono inoltre stati inclusi 20 soggetti sani, donatori di sangue. I sieri sono analizzati con kit VARELISA Rib PO, P1, P2 antibodies (gentilmente offerto da Pharmacia, Freiburg, Germany, a scopo di ricerca). Il test consiste in una metodica immunoenzimatica indiretta non competitiva in cui come antigene viene usato il ricombinante delle proteine P0, P1, P2 ribosomiali umane, espresso con il sistema Baculovirus /Sf9cell. Tutti i sieri venivano testati per gli anticorpi IgG/IgM aCL

Risultati: Gli anticorpi anti-P erano positivi soltanto in 2/20 LES (>10 U/ml) e 3 sieri (LES) risultavano equivoci (range 5 -10 U/ml), confermando la prevalenza, precedentemente riportata da altri autori, di 10-20% in pazienti affetti da LES. Tutti i sieri rimanenti risultavano negativi per anti-P, suggerendo un'alta specificità del test. Nella nostra casistica di pazienti non abbiamo trovato alcuna correlazione fra anti-P e aCL, probabilmente per l'esiguo numero di sieri positivi agli anti-P.

Conclusioni: Concordemente ai risultati ottenuti nel nostro studio, possiamo considerare gli anti-P marker specifici di LES. I nostri dati, anche se preliminari, non confermano quanto riportato da altri autori circa l'associazione degli anti-P con gli aCL.

PREVALENZA DEGLI ANTICORPI ANTI-ALPHA-FODRINA IN ALCUNE MALATTIE REUMATICHE

B-09

G. Morozzi, A. Simpatico, G. Pucci, S. Cucini, MR. Bacarelli

Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Sezione di Reumatologia, Università di Siena

Scopo dello Studio: studiare la prevalenza degli anticorpi anti-alfa-fodrina in pazienti affetti da sindrome di Sjogren primitiva (SS) e altre malattie reumatiche.

Pazienti e Metodi: sono stati analizzati i sieri di 18 SS, 21 lupus eritematoso sistemico (LES), 15 sclerosi sistemica (SSc), 20 artriti reumatoidi (AR) per la presenza di anticorpi anti-alfa-fodrina IgA/IgG, utilizzando un kit commerciale in ELISA (DiaMedix, Miami, USA), con alfa-fodrina umana altamente purificata, come antigene. Tutti i sieri venivano testati per la presenza di ANA e anti-ENA. Dei 20 pazienti affetti da AR, 14 erano trattati con adalimumab, i cui sieri venivano raccolti al tempo 0 e dopo 12 mesi dall'inizio del trattamento.

Risultati: La prevalenza degli anti-alfa-fodrina di classe IgG era: 5/18 (28 %) in SS, 4/21 (19 %) in LES, 3/15 (20%) in SSc, 6/20 (30%) in AR. La prevalenza degli anti-alfa-fodrina di classe IgA era: 3/18 (17%) in SS, 9/21 (43%) in LES, 5/15 (33%) in SSc, 8/20 (40%) in AR. La prevalenza del complesso anti-SSA and/or SSB nella nostra casistica di pazienti era: in SS 80% (60% -SSA) e 52% in LES. In LES abbiamo trovato un'associazione fra anti-SSA e IgA anti-alfa-fodrina (odds ratio=7, p=0.07 n.s.). Il trattamento con anti-TNFalfa nei pazienti affetti da AR non varia i livelli degli anticorpi anti-alfa-fodrina.

Conclusioni: I nostri risultati sono in accordo a quelli recentemente segnalati in letteratura circa la scarsa validità diagnostica degli anti-alfa-fodrina nella sindrome di Sjogren. In aggiunta, abbiamo trovato che il trattamento terapeutico per un anno dei pazienti affetti da AR con anti-TNFalfa non modifica la produzione degli anticorpi anti-alfa-fodrina. Dato l'esiguo numero di pazienti esaminati, sono in corso studi di ampliamento della casistica di AR trattati con anti-TNFalfa per confermare questi dati preliminari.

SPECIFICITÀ DEGLI ANTICORPI ANTI-PEPTIDI CITRULLINATI. UNA METANALISI SU 4.273 PAZIENTI CON MALATTIE REUMATICHE, INFETTIVE E OSTEO-DEGENERATIVE

B-10

N. Bizzaro

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di S. Donà di Piave

L'importanza diagnostica degli anticorpi anti-peptidi citrullinati (CCP) è legata soprattutto alla elevata specificità per la diagnosi di artrite reumatoide (AR).

Attraverso una ricerca on-line e su atti congressuali sono stati individuati 36 lavori scientifici prodotti dal 1998 al 2004 relativi a studi di specificità sugli anticorpi anti-CCP. Tra questi, ne sono stati successivamente selezionati 15 in cui era presente una chiara ripartizione dei gruppi di patologia studiati e delle percentuali di positività riscontrate.

Su 4.273 pazienti complessivamente studiati, affetti da 52 diverse patologie, la specificità è risultata variare dal 92% dell'artrite da microcristalli e delle spondilite sieronegative, al 96-100% delle connettiviti e delle malattie autoimmuni organo-specifiche, con un valore medio del 97.5%.

Come confermato da quest'ampia metaanalisi sui dati disponibili in letteratura, la elevata specificità diagnostica degli anticorpi anti-CCP, superiore al 99% nei soggetti sani e al 97% nei pazienti con malattie che entrano in diagnostica differenziale con l'AR, ne fanno ormai un parametro clinico irrinunciabile per una corretta e tempestiva diagnosi di AR.

Patologia	n. paz.	spec %	Patologia	n. paz. s	pec. %	Patologia	n. paz. s	pec. %
LES	757	95.5	Artr. cristalli	25	92	Crohn	52	100
Sjogren	325	99.1	Artr. giovanile	117	98.3	Rettocolite	58	100
Sclerodermia	266	95.5	M. di Still	10	100	Epatite autoim.	10	100
Polimiosite	184	100	Artr. psoriasica	104	97.1	Sclerosi multipla	47	100
MCTD	54	98.1	Spondilite anch.	67	100	Tiroiditi autoim.	89	98.9
UCTD	7	00	Spondiloartriti	167	92.2	Neoplasie varie	44	100
APS	10	100	Osteoartrosi	148	94.6	Mal. virali	291	98.3
Vasculiti	47	95.7	Polimialgia reu.	73	97.2	Mal. batteriche	358	96.6
Wegener	25	96	Fibromialgia	10	100	Soggetti sani	820	99.6
Arter. Horton	17	100	Artr. reattiva	91	95.6	Totale	4.273	97.5

IL LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA NELLA DIAGNOSI DELLA MALATTIA CELIACA

B-11

R. Pica, C. Castellano, M. Ciabatta, M. Ruggeri

UOD Medicina di Laboratorio I Azienda Ospedaliera San Giovanni-Addolorata-Calvary Hospital, Roma

Introduzione. La malattia celiaca (MC) è un'intolleranza permanente al glutine, di eziologia multifattoriale, le cui manifestazioni cliniche sono varie. Esistono forti evidenze che l'appartenenza a determinati aplotipi HLA sia una condizione predisponente, necessaria ma non sufficiente, ed è ipotizzata la responsabilità di altri geni e/o di fattori ambientali (virus?). Sebbene l'organo-bersaglio sia l'intestino tenue (malassorbimento), la celiachia può essere considerata una malattia sistemica, con interessamento di molti organi ed apparati. Le manifestazioni clinico-patologiche e la sintomatologia regrediscono del tutto dopo instaurazione di un regime dietetico privo di glutine (gluten free diet, GFD). La prevalenza della MC nella popolazione riportata in letteratura è dello 0,5 - 1%, con un rapporto maschi: femmine di 1:2. L'introduzione dei test sierologici ha mostrato una frequenza insospettata di casi a varia espressività clinica ed ha contribuito a definire le forme atipiche, silenti e latenti: i celiaci latenti sembra siano a maggior rischio di complicanze.

Metodi. Gli anticorpi anti endomisio (EMA), in genere della classe IgA, sono evidenziabili con metodica IFA, impiegando come substrato l'endomisio del muscolo liscio del terzo distale dell'esofago di scimmia oppure le cellule del cordone ombelicale umano. Gli anticorpi anti gliadina (AGA) e gli anti transglutaminasi tissutale (AtTG) di classe IgA ed IgG sono determinati con metodica ELISA. La transglutaminasi è responsabile della deamidazione dei peptidi di gliadina, con formazione di acido glutammico, idoneo a reagire con gli eterodimeri DQ2 e DQ8, da cui risulta l'attivazione della risposta linfocitaria. Quello genetico è un test di amplificazione genica per la ricerca degli aplotipi HLA DQ2 e DQ8, che codificano per specifici eterodimeri a/b, ritenuti responsabili della risposta immunitaria del soggetto celiaco.

Discussione e Conclusioni. La nostra esperienza di circa 3000 determinazioni sierologiche negli ultimi 2 anni mostra una positività dell'1,7%: i campioni positivi si riferiscono a diverse fasce di età, anche se la più rappresentata sembra essere quella dai 20 ai 50 anni; il sesso femminile risulta colpito con frequenza doppia rispetto al maschile. I test AtTG ed EMA, sensibili e specifici, rispondono più degli altri al requisito di appropriatezza diagnostica; la loro concordanza è del 99,4%, ma si riduce nei celiaci dopo GFD. Il test genetico, da noi sperimentato e di prossima introduzione, è dotato di valore predittivo negativo e trova indicazione nello screening dei gruppi a rischio (familiari di celiaci o soggetti con patologie autoimmuni associate alla celiachia). Importante è la diagnosi differenziale con linfoma intestinale, giardiasi e strongiloidiasi.

LA COMPLIANCE ALLA DIETOTERAPIA IN CORSO DI MALATTIA CELIACA PUO' ESSERE MONITORATA CON I TESTS IMMUNOLOGICI

B-12

M. Antonacci

Laboratorio di Analisi - "Casa Sollievo della Sofferenza" I.R.C.C.S. - San Giovanni Rotondo (FG)

Scopo del Lavoro. La Malattia Celiaca (MC) è definita come una intolleranza *permanente* al glutine, caratterizzata da atrofia dei villi intestinali e da remissione clinica ed istologica dopo dieta priva di glutine (GFD, *Gluten Free Diet*). La risposta alla dietoterapia è talmente costante che, in caso di insuccesso, bisognerebbe pensare all'insorgenza di gravi complicanze (linfoma), ma quasi sempre la cosa è da imputare ad una non ottimale aderenza alla GFD, spesso involontaria. La ricognizione di questi casi è di fondamentale importanza. Lo studio si propone di evidenziare se, ed in quale misura, i singoli tests immunologici, non invasivi, si modificano in seguito a GFD.

Materiali e Metodi. Sono stati seguiti 147 celiaci dalla diagnosi fino a 24 mesi dopo l'istituzione della GFD determinando gli AGA (IgA, IgG) e gli EMA-IgA a distanza di 3, 6, 12 e 24 mesi. La diagnosi di MC è stata posta secondo i criteri dell'ESPGAN, gli AGA sono stati eseguiti in *elisa sandwich*, gli EMA in immunofluorescenza indiretta usando come substrato il terzo inferiore di esofago di scimmia.

Risultati. Alla diagnosi gli AGA-IgG erano positivi in 123/147 (83,7%) casi, gli AGA-IgA in 119/147 (80,9%) casi e gli EMA-IgA in 114/147 (77,6%). In tabella sono riportati, per ciascun test, il numero dei casi ancora positivi dopo 3, 6, 12 e 24 mesi con le relative percentuali calcolate sul numero dei casi positivi alla diagnosi:

		Dopo:	3 mesi di GFD	6 mesi di GFD	12 mesi di GFD	24 mesi di GFD
AGA-IgG (Pos.: 123)	n.		115	72	21	3
	%		93,5	58,5	17,1	2,4
AGA-IgA (Pos.: 119)	n.		81	29	2	0
	%		68,1	24,4	1,7	0
EMA-IgA (Pos.: 114)	n.		112	82	24	4
	%		98,2	71,9	21,1	3,5

Conclusioni. I più pronti predittori di una buona *compliance* alla GFD sono risultati gli AGA-IgA, mentre gli AGA di classe IgG permangono troppo a lungo sia per la maggiore emivita delle IgG, sia per la presenza di cellule memoria. Gli EMA-IgA, invece, essendo espressione del danno mucosale, restano in circolo, a titoli significativi, fino alla remissione istologica della mucosa. Non abbiamo ancora una casistica correlabile per quanto riguarda gli ac. Antitransglutaminasi di classe IgA, data la loro più recente introduzione, ma i primi dati suggeriscono una maggiore affidabilità degli EMA-IgA, pur a fronte di una soddisfacente correlazione fra i due tests, come abbiamo documentato in altri studi tendenti a raffrontare le due metodiche.

SERVE UNA CONFERMA PER I CAMPIONI ANTI-TTG POSITIVI?**B-13****E. Marzot, M. Negri, G. Soffiati**

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia-Ospedale "S.Bortolo" - Vicenza

Scopo del lavoro. Secondo le ultime linee-guida gli anticorpi anti-transglutaminasi tissutale (tTG) sono considerati marker sierologico per il Morbo Celiaco (MC) e si consiglia la conferma dei campioni positivi con la ricerca degli anticorpi anti-endomisio (EMA). Abbiamo valutato l'utilità di tale conferma nei campioni con valori misurabili di anti-tTG.

Materiali e metodi. Dal Gennaio 2001 per lo screening e il monitoraggio del MC viene eseguita la determinazione degli anti-tTG (kit ELISA Celikey - Pharmacia Italia); vengono considerati positivi campioni con concentrazione >8 U/mL, con una "zona grigia" per valori tra 5 e 8 U/mL. Su tutti i campioni con valori di anti-tTG >3 U/mL è stata eseguita la ricerca degli EMA (IFI su esofago di scimmia - Euroimmun Italia).

Risultati. I risultati delle 6070 determinazioni eseguite in 3 anni sono riassunti nella tabella.

Discussione e conclusioni. La conferma di concentrazioni misurabili di anti-tTG con la ricerca degli EMA, test con pari specificità ma minor sensibilità e maggior soggettività interpretativa, ha mostrato concordanza tra i risultati per campioni francamente negativi (anti-tTG <5 U/mL) o francamente positivi (anti-tTG >8 U/mL) e discordanza solo per campioni che cadono nella "zona grigia" (anti-tTG 5-8 U/mL), risultando quindi utile solo in quest'ultimo caso.

TTG IgA U/mL	N° casi EMA	negativo EMA	positivo	Concordanza %
Inf. 5	16	16	0	100
5 - 8	48	26	22	54 (p < 0.01)
Sup. 8	211	0	211	100 (p < 0.0001)

VACCINAZIONE PER TBEV IN ETÀ PEDIATRICA A BELLUNO**B-14****S. Mancuso, M. Battistel, G. Da Pra, M. Forni*, R. Mel, N. Papa*, F. Russino, G. Bertiato***

Servizio Igiene e Sanità Pubblica, ULSS n. 1 Belluno; *Centro Regionale di riferimento per la diagnosi delle malattie trasmesse da zecche, ULSS n. 1 Belluno

Il morso di zecca può trasmettere all'uomo numerosi agenti patogeni tra cui un virus responsabile di una severa encefalite (TBE - tick-borne encephalitis o encefalite trasmessa da zecca), con possibili caratteri di gravità sia per il quadro clinico che per le sequele a carico del SN centrale e periferico. Epidemiologia. Nell'ULSS n.1 di Belluno il primo caso di TBE è stato diagnosticato nel 1994. Da allora sono stati notificati (ai sensi del D.M.15.12.90) 98 casi di malattia. Una indagine sieroepidemiologica condotta nel 1997 su un campione di popolazione generale residente in zona a rischio dell'ULSS n.1 di Belluno ha dimostrato una prevalenza di sieropositività del 1,8% a titolo significativo per anticorpi anti-TBE; dato in linea con quanto riportato da altri studi nazionali.

Profilassi attiva. Si basa sulla somministrazione di vaccino a base di virus interi inattivati, allestiti su cellule di embrione di pollo con schedula di base ai tempi 0, 1-3 mesi, 9-12 mesi, dosi di richiamo ogni 3 anni, per via intramuscolare, preferibilmente in regione deltoidea. A Belluno la vaccinazione anti-TBE è iniziata nel 1996 con impiego del vaccino FSME-Immuno, e a tutto il 2002 sono state somministrate circa 5000 dosi a soggetti a rischio volontari, prevalentemente adulti.

Scopo dello studio. La ricerca si è proposta di verificare la sieroconversione in bambini vaccinati secondo il dettato ministeriale, e la correlazione tra test ELISA, HI e di neutralizzazione.

Materiali e metodi: Nel periodo settembre-ottobre 2003 hanno completato il ciclo vaccinale 38 bambini di età compresa tra 6 e 12. Lo studio anticorpale è avvenuto presso il Laboratorio di Belluno con test ELISA e il Laboratorio di Virologia dell'I.S.S. di Roma per i test di conferma.

Risultati. Tutti i bambini vaccinati hanno sviluppato una risposta anticorpale significativa. Tra i risultati del test ELISA e quelli del test di inibizione dell'emoagglutinazione-HI è stata evidenziata completa correlazione. Si è notata una variabilità nei titoli anticorpali del test HI rispetto all'omogeneità dei risultati dell'ELISA, che può essere giustificata da una maggior specificità del primo test. Non è stata evidenziata correlazione tra i risultati e il tempo trascorso tra la terza dose di vaccino e la successiva data del prelievo, anche se la limitata numerosità dei campioni non ha permesso elaborazioni statistiche significative. In un caso è risultata positiva la ricerca degli anticorpi Ig M, per una probabile infezione naturale.

Conclusioni. La TBE costituisce un problema di sanità pubblica nelle zone endemiche e rende necessaria l'adozione di efficaci misure di prevenzione. Tra queste è da annoverare la possibilità di ricorrere alla vaccinazione nei soggetti particolarmente esposti al rischio di infezione.

PREMATURETÀ E CELIACHIA: RISULTATI PRELIMINARI DI UNO STUDIO MULTICENTRICO LOMBARDO

B-15

S. Finazzi, M. Lotzniker, G. Re., V. Grazioli*, G.V. Zuccotti °, G.V. Melzi d'Eril**

PremaCel Study Group Laboratorio Analisi e ° U.O. Pediatria A.O. Ospedale Civile di Legnano; * Laboratorio Analisi Istituto Clinico Humanitas Rozzano (MI); **Università degli Studi di Milano

La malattia celiaca non trattata può influenzare sfavorevolmente l'apparato riproduttivo, tuttavia, non è ancora completamente chiarito se la celiachia non diagnosticata rappresenti nella popolazione generale un significativo fattore di rischio per prematurità e/o dismaturità. I meccanismi sottostanti alle alterazioni riproduttive necessitano ancora di chiarificazione; si ipotizza un'interazione tra specifici deficit nutrizionali e squilibri endocrini ed immuni.

Scopo dello studio. Scopo di questo lavoro è valutare la prevalenza della malattia celiaca tra i genitori di bambini prematuri e/o dismaturi e di confrontarla con quella della popolazione generale italiana (1:174 secondo Volta e coll. Dig Dis Sciences 2001; 46(7): 1500-1505).

Materiali e metodi. Dal maggio 2003 uno studio prospettico e multicentrico, denominato PremaCel Study Group, è stato avviato tra 12 UO di Pediatria e Neonatologia della Regione Lombardia con lo scopo di arruolare 2000 genitori di 1000 neonati nati prematuri (età gestazionale < 37a settimana) e/o dismaturi (peso alla nascita <10° percentile). Sino ad oggi sono stati reclutati 984 genitori (492 madri e 492 padri corrispondenti al 98.9% di tutti i genitori di neonati prematuri e/o dismaturi) In entrambi i genitori sono stati determinati, dopo consenso informato, le IgA plasmatiche (metodo immunoturbidimetrico, Roche Diagnostics) e gli anticorpi antitranglutaminasi IgA (t-TG)(Eu t-TG IgA Eurospital). I campioni positivi per t-TG sono stati confermati con gli anticorpi antiendomisio (EMA) (IFI su esofago di scimmia, INOVA).

Risultati. Cinque genitori (3 madri e 2 padri) sono risultati positivi per anticorpi anti t-TG, positività confermata anche dalla determinazione degli EMA. Tali soggetti sono in attesa di biopsia per la conferma diagnostica. Due genitori sono risultati affetti da deficit di IgA plasmatiche e sono in attesa di dosaggio di dosaggio di t-TG IgG. La prevalenza sin qui stimata è risultata essere pari a 1:197 non significativamente diversa rispetto a quella della popolazione generale di riferimento (1:174).

Conclusioni. I nostri dati mostrano una prevalenza di celiachia nei genitori di dismaturi e/o prematuri non significativamente differente dalla popolazione generale stimata nello studio di Volta e collaboratori e sembrerebbero attualmente escludere il ruolo della celiachia materna e paterna come fattore di rischio per prematurità e/o dismaturità.

ACCURATEZZA DIAGNOSTICA DEL DOSAGGIO DEGLI ANTICORPI ANTI-SmD1 NEL LES

B-16

R. Tozzoli, G. Kodermaz

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Latisana (Udine)

Scopo del lavoro. Gli anticorpi anti-Sm (SmAb) costituiscono un marcatore poco sensibile, ma molto specifico del lupus eritematoso sistemico; essi sono diretti contro l'antigene Smith, rappresentato da un eptamero polipeptidico (B/B', D1, D2, D3, E, F, G), che costituisce il 'core' dello spliceosoma, organulo che provvede alla maturazione dell'RNA messaggero. Gli anticorpi anti-Sm sono diretti prevalentemente contro i polipeptidi B/B' e D: epitopi immunodominanti sono stati identificati nel polipeptide D1, ove sono presenti sequenze costituite da unità ripetute contenenti DMA simmetriche, in particolare nel segmento aminoacidico 83-117, epitopo T linfocitario riconosciuto dalla maggior parte dei sieri di pazienti affetti da LES. Scopo del presente lavoro è stata la valutazione dell'accuratezza diagnostica del dosaggio quantitativo degli anticorpi anti-SmD1 83-119 in pazienti affetti da LES e da altre malattie reumatiche e non mediante l'impiego di un nuovo metodo ELISA e della correlazione dei risultati ottenuti nel LES con altri metodi immunologici per il dosaggio di SmAb.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 396 pazienti, di cui 100 affetti da LES, 62 affetti da altre malattie reumatiche (24 sclerodermia, 9 sindrome di Sjogren, 29 artrite reumatoide), 85 affetti da malattie organo-specifiche (35 celiachia, 50 tireopatie autoimmuni), 50 pazienti affetti da malattie infettive, 99 soggetti sani.

È stato utilizzato un metodo immunoenzimatico quantitativo commerciale ad antigene peptidico sintetico SmD1 83-119 (Imtec, Berlin, Germany). Sui sieri dei pazienti affetti da LES sono stati ricercati gli anticorpi anti-Sm con altri 6 metodi immunologici, 4 ELISA e 2 Immunoblot, con diverse preparazioni antigeniche nella fase solida.

Risultati. Mediante l'impiego della curva ROC sui dati ottenuti, si è ottenuto un valore soglia di 25 UA/mL: a questa concentrazione la sensibilità è del 66% e la specificità dell'84.1%. Nei pazienti affetti da LES i sieri sono stati testati anche con gli altri 6 metodi: le percentuali di positività ottenute oscillavano dal 21% al 54%. La correlazione più stretta è stata osservata con i metodi ad antigene 'intero' Sm, e ad antigene D:

- in 43 sieri negativi con gli altri metodi, il 95.3% presentavano valori di SmD1Ab inferiori a 50 UA/mL;
- in 57 sieri positivi con gli altri metodi, il 94.7% presentavano valori di SmD1Absuperiori a 25 UA/mL;
- 23 pazienti positivi ai metodi con antigene Sm 'intero', presentavano valori elevati di SmD1Ab, superiori a 70 UA/mL;
- 18 pazienti con positività al polipeptide D presentavano valori di SmD1Ab molto elevati, tutti superiori a 120 UA/mL.

Discussione e conclusioni. Il test per anticorpi anti-Sm D183-119 presenta una elevata sensibilità diagnostica, superiore a quella di tutti gli altri metodi commerciali per la determinazione degli anticorpi anti-Sm, sia quelli diretti verso la molecola intera, sia quelli rivolti verso i singoli polipeptidi. Il test per SmD1Ab presenta quindi un significato importante in fase diagnostica, in quanto è in grado di comprendere gran parte delle positività agli altri metodi (95%): l'ampia reattività SmD1 83-119 può dipendere da fenomeni di estensione epitopica con condivisione di epitopi cross-reattivi, quale quello immunodominante per i linfociti T, rappresentato dalle sequenze ripetute contenenti sDMA.

IMMUNOREATTIVITÀ ISOLATA ALLA TIREOGLOBULINA NELLE TIROIDITI CRONICHE AUTOIMMUNI

B-17

R. Tozzoli, G. Kodermaz

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Latisana (Udine)

Scopo del lavoro. Il dosaggio degli anticorpi anti-perossidasi tiroidea (TPOAb) è considerato il test più sensibile per la diagnosi della tiroidite cronica linfocitaria (HT) (1,2): si ritiene che livelli alterati di TPOAb nei pazienti affetti superi il 99% e che conseguentemente i risultati clinicamente falsi negativi siano molto rari (3). Per questi motivi il dosaggio di TPOAb è stato proposto come unico test per la diagnosi della HT (1).

Dato che la reale percentuale di pazienti affetti da HT con isolata positività agli anticorpi anti-tireoglobulina (TgAb) non è completamente conosciuta e che non sono noti studi recenti con l'impegno di metodi di seconda generazione, l'obiettivo del lavoro è stata la valutazione dell'accuratezza diagnostica del dosaggio di TPOAb e TgAb nei pazienti affetti da HT e della prevalenza della positività isolata per TgAb, mediante l'impiego di un metodo a determinazione multipla simultanea.

Materiali e metodi. Lo studio ha coinvolto complessivamente 561 pazienti, di cui 111 pazienti affetti da tiroidite cronica linfocitaria (di Hashimoto), 116 soggetti sani, 120 pazienti affetti da malattie infettive, 79 pazienti affetti da malattie autoimmuni organo-specifiche (40 morbo di Graves-Basedow, 39 morbo celiaco), 135 pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche (49 lupus eritematoso sistemico, 30 artrite reumatoide, 29 sclerodermia, 30 sindrome di Sjogren). Per la determinazione di TgAbs e TPO Abs è stato utilizzato il sistema analitico automatico FIDIS (BioMedical Diagnostics, Marne La Vallée, France), che consente il dosaggio quantitativo simultaneo multiplo dei due anticorpi.

Risultati. L'analisi dei risultati mediante l'impiego di curve ROC ha prodotto valori soglia (sensibilità-specificità) pari a 150 UI/mL per TPOAb e 120 UI/mL per TgAb. Nella tiroidite di Hashimoto la sensibilità diagnostica del test per TPOAb è stata pari a 91.9%, mentre nel gruppo di controllo la specificità diagnostica è stata pari a 92.7%.

Utilizzando entrambi i test, la sensibilità diagnostica è del 98.2%: in particolare su 111 pazienti, 7 presentano positività isolata a TgAbs, con una percentuale pari a 6.3%.

Discussione e conclusioni. Dai risultati del presente studio emerge che 1 paziente su 20 affetto da tiroidite autoimmune presenta la sola positività agli anticorpi anti-tireoglobulina: la positività isolata a TgAb non quindi è rara ed è spesso sottovalutata: tale condizione suggerisce la necessità del dosaggio di entrambi i tipi di autoanticorpi (4), oggi possibile con metodi automatizzati, quantitativi, simultanei.

Bibliografia

1. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, Demers LM, Feldt-Rasmussen U, Henry JF, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003; 13: 3-126.
2. Hollowell J, Staehling NW, Flanders WD, Hannon VH, Gunter EW, Spencer C, et al. Serum TSH, T4, and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 489-99.
3. Topliss DJ, Eastman CJ. Diagnosis and management of hyperthyroidism and hypothyroidism. *MJA* 2004; 180: 186-93.
4. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N, Tonutti E, Manoni F. Laboratory diagnosis of autoimmune thyroid disease. *Recenti Prog Med* 2001; 92: 609-17.

CELIACHIA, QUALI TEST PER UNA DIAGNOSI SIEROLOGIA CORRETTA? LA NOSTRA ESPERIENZA

B-18

C. Puccetti, R. Berni, M. Bozzi, MR. Metelli, E. Panicucci, P. Pietrini

U.O. Analisi Chimico Cliniche Specializzate, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana

Scopo dello studio. Una diagnosi rapida e sicura di celiachia è di fondamentale importanza per il paziente, in questo la diagnostica di laboratorio assume un ruolo primario. La transglutaminasi tissutale rappresenta il principale auto-antigene coinvolto nella patogenesi della malattia celiaca, contro il quale sono rivolti gli anticorpi anti-endomisio (EMA). Elevate concentrazioni di anticorpi IgA anti-transglutaminasi (tTG) ed elevati titoli di anticorpi anti-endomisio IgA (EMA) sono caratteristici della malattia celiaca in tutti i casi in cui non è presente un deficit totale o parziale di IgA. Nei pazienti celiaci con questa immunodeficienza (incidenza di 1:400-500), si ritrovano concentrazioni elevate solo degli anticorpi IgG anti-transglutaminasi. Al momento anticorpi IgA e IgG anti-tTG e anticorpi IgA anti-EMA possono essere utilizzati a scopo diagnostico. Il nostro studio ha valutato il valore diagnostico di due test ELISA commercialmente disponibili per il dosaggio degli anticorpi IgA e IgG anti-tTG basati sull'utilizzo dell'antigene umano ricombinante tTG e quello per la ricerca di anticorpi IgA anti-EMA su un singolo frammento di esofago di scimmia in immunofluorescenza indiretta.

Materiali e metodi. Abbiamo realizzato uno studio di confronto tra due test per la ricerca degli anticorpi IgA ed IgG anti-tTG e la ricerca degli anticorpi IgA anti-EMA in due gruppi definiti di soggetti:

36 bambini affetti da celiachia diagnosticata secondo i criteri ESPGHAN e non ancora sottoposti a dieta priva di glutine (20 femmine e 16 maschi di età compresa tra 2 e 10 anni) di cui 10 con deficit di IgA. 33 bambini non affetti da tale malattia (16 femmine e 17 maschi di età compresa tra 2 e 10 anni). Il siero di questi bambini è stato testato per la ricerca di anticorpi IgA ed IgG anti-tTG e per la ricerca di anticorpi IgA anti-EMA. La ricerca degli anticorpi IgA anti-EMA è stata realizzata su un singolo frammento di esofago di scimmia con un metodo di immunofluorescenza indiretta. La ricerca degli anticorpi anti-tTG di classe IgA ed IgG sono state realizzate mediante test ELISA che utilizzano anticorpi anti-tTG umana ottenuta con tecniche DNA-ricombinanti nel sistema Baculovirus/cellule di insetto Sf9.

Risultati. Dei 36 pazienti celiaci, 26 presentano anticorpi IgA anti-EMA ed elevati livelli di anticorpi IgA anti-tTG (Tab I), mentre i 10 pazienti celiaci con deficit di IgA ovviamente non hanno anticorpi IgA anti-EMA ed hanno valori di anticorpi IgA anti-tTG bassi, mentre gli anticorpi IgG anti-tTG sono presenti in concentrazioni abbastanza elevate (Tab II). I 33 pazienti non celiaci hanno livelli di anticorpi IgA ed IgG anti-transglutaminasi bassi e la ricerca degli anticorpi anti-EMA risulta negativa (Tab. III).

Discussione e conclusioni. I risultati si sono dimostrati perfettamente sovrapponibili, ciò evidenzia innanzitutto che il test per la ricerca degli anticorpi IgA anti-tTG da noi utilizzato è un valido supporto alla diagnostica per celiachia. Tale indagine può essere pensata come valida alternativa al test EMA che, come test diagnostico presenta lo svantaggio di essere influenzato dalla soggettività e quindi di essere osservatore-dipendente. Inoltre, grazie al test per la ricerca degli anticorpi IgG anti-tTG è oggi possibile convalidare la diagnosi con un test di laboratorio anche i quei soggetti che presentano un deficit totale o parziale di IgA.

Tab. I. Celiaci

	EMA (IgA)	tTG IgA
positivi	26	26
negativi	0	0

Tab. II. Celiaci con deficit IgA

	EMA (IgA)	tTG (IgA)	tTG (IgG)
positivi	0	0	10
negativi	10	10	0

Tab. III. Non Celiaci

	EMA (IgA)	tTG (IgA)	tTG (IgG)
positivi	0	0	0
negativi	33	33	33

MONITORAGGIO DELL'INTERLEUCHINA 6, PROTEINA C REATTIVA E SIEROAMILOIDE A IN PAZIENTI CON SEPSI

B-19

MR. Metelli, F. Fulceri, F. Manzone, C. Puccetti, E. Panicucci, F. Giunta °, P. Pietrini

U.O. Analisi Chimico Cliniche Specializzate, °U.O. Anestesia e Rianimazione IV, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana

Scopo del lavoro. Lo scopo del presente studio è indirizzato alla valutazione nel tempo dei livelli di alcuni mediatori solubili dell'infiammazione, quali l' Interleuchina 6 (IL-6), la Proteina C Reattiva (PCR) e la SieroAmiloide A (SAA), in pazienti con sepsi più o meno severa, al fine di utilizzare tali molecole come marker di infiammazione e di danno tissutale, in pazienti che presentano quadri clinici molto complicati.

Materiali e metodi. Lo studio è stato condotto su campioni di sangue ottenuti da 20 pazienti di età compresa tra 21 ed 83 anni (56 ± 22 , media \pm SD), ricoverati nel reparto di Anestesia e Rianimazione per sepsi. I prelievi di sangue sono stati eseguiti al momento dell'arrivo al reparto e nei giorni successivi per il periodo di degenza in tale reparto, in momenti diversi della giornata. I campioni biologici sono stati conservati, dopo opportuna separazione, a -20°C , sino al momento del dosaggio per la SAA e per l' IL-6, mentre per la PCR i campioni sono stati dosati al momento dell'arrivo al laboratorio. Sono state testati i livelli di SAA e di IL-6 con metodiche ELISA (Biosource International, Technogenetics s.r.l.) e di PCR con metodo nefelometrico (Dade Behring S.p.A.).

Risultati. I pazienti in studio sono stati ulteriormente suddivisi in due gruppi in base alla diversità nella risposta alla sepsi. Il gruppo A comprendeva 12 pazienti che sono andati incontro a risoluzione della sepsi durante il ricovero. Il gruppo B includeva 8 pazienti andati incontro ad exitus per complicanze. I dati valutati hanno evidenziato una significativa differenza dei livelli di concentrazione per la PCR ed IL-6 tra inizio e fine del periodo di monitoraggio, nei pazienti del gruppo A (media 24.7 e 10.3 mg/dl, test t per dati appaiati = 2.825, $p = 0.01$) e (media 947.9 e 286.8 pg/ml, test t per dati appaiati = 2.157, $p = 0.04$) rispettivamente , mentre i livelli di PCR ed IL-6 si mantengono pressoché costantemente elevati nei pazienti del gruppo B (media 20.7 e 24.9 mg/dl, test t per dati appaiati = -0.493, $p = 0.631$) e (media 174.1 e 796.5 pg/ml, test t per dati appaiati = -1.7, $p = 0.11$) I dati per la SAA sono rimasti pressoché costantemente elevati nei due gruppi di pazienti esaminati non evidenziando differenze statisticamente significative tra l' inizio e la fine del monitoraggio.

Discussione e conclusioni. Questi primi risultati suggeriscono che l' IL-6 e la PCR possono essere utilizzati come parametri attendibili per caratterizzare la risposta immunitaria, i dati infatti mostrano una buona correlazione con l'ampiezza della risposta immunitaria e la severità della malattia. La SAA esibisce in tali pazienti un più intenso incremento rispetto alle altre molecole testate , ed evidenzia la non risoluzione dell' episodio infiammatorio con il non rientro dei valori di tale proteina , anche se i pazienti rispondono alla terapia.

TACROLIMUS (FK 506): IMMUNOMODULAZIONE E SUO MONITORAGGIO

B-20

A. Dardano, R. Ierinò, R. Le Donne, F. Iuliano*

Cattedra di Patologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "Magna Graecia"; U.O. di Ematologia*, Azienda Pugliese-Ciaccio, Catanzaro

Scopo del Lavoro. Un numero sempre maggiore di pazienti vengono sottoposti a terapie capaci di modulare la risposta immunitaria a differenti livelli. Tra i farmaci impiegati, il Tacrolimus (FK 506) un inibitore della Calcineurina che in vitro ha un effetto simile alla Ciclosporina, in vivo dimostra effetti che possono essere differenti, non solo in relazione alla situazione clinica, all'evoluzione della malattia, ma anche in base alla somministrazione di altre molecole. L'obiettivo principale delle terapie immunomodulanti consiste nell'orientare la risposta in senso Th1 o Th2. Scopo del nostro lavoro è quello di valutare gli effetti della terapia con Tacrolimus in relazione al determinarsi del "field citochinico" più efficace.

Materiali e Metodi. Sono stati arruolati nello studio 16 pazienti di entrambi i sessi ed età compresa tra 23 e 63 anni. 8 affetti da PTI, 5 dei quali trattati con basse dosi di Tacrolimus (livelli sierici tra 5-15 ng/ml); 5 con AEA; 1 con Piastrinopenia ndd; 2 con Psoriasi, anche loro sottoposti a terapia con basse dosi di Tacrolimus. In tutti i pazienti sono stati dosati i livelli plasmatici di IL-2, IL-2R, IFN-gamma, IL-10, con metodica Elisa (R&D Systems) su almeno tre campioni prelevati a distanza di due mesi uno dall'altro.

Risultati. In tutti i pazienti sottoposti a terapia con Tacrolimus, nell'arco di tempo di 12 mesi, si è potuta osservare la remissione clinica della malattia ed in quelli affetti da PTI l'incremento del numero delle piastrine $>110.000/\text{mm}^3$. Sono stati misurati valori superiori a quelli di riferimento di IL-10, IL-2R e valori minimi di IFN-gamma e IL-2 sia nei campioni prelevati dopo due mesi dall'inizio del trattamento sia in tutti quelli successivi.

Discussione e Conclusioni. I nostri dati dimostrano che il farmaco è capace di indurre una risposta citochinica orientata, anche somministrato a bassi dosaggi, in maniera rapida e stabile. In particolare, l'incremento precoce e costante di IL-10 dimostra l'effetto di controllo sulla fase effettrice della risposta immunitaria svolto dal farmaco, che sembra favorire lo sviluppo del "field" di tipo Th2 ed il controllo della risposta flogistica. Il dosaggio di IL-10 è appropriato per valutare la ripresa funzionale del sistema immunitario e per il monitoraggio dei pazienti sottoposti a terapia immunomodulante con Tacrolimus.

INDAGINE SIEROLOGICA PER MALATTIA CELIACA IN UNA SCUOLA VITERBESE

B-21

S. Zolla *, **AR. Celsi ***, **R. Buzzi ***, **MC. Luiso ****

* Laboratorio Analisi ASL Viterbo; ** ARPA Lazio, Sez. di Viterbo

Scopo del lavoro: obiettivo del lavoro è valutare la positività ai test sierologici (IgA anti-transglutaminasi ed EMA) per la malattia celiaca in una scuola media superiore di Viterbo.

Materiali e metodi: hanno aderito alle indagini sierologiche, su base volontaria, 183 ragazzi compresi tra una fascia di età dai 14 ai 19 anni: 31 maschi e 152 femmine. La ricerca degli anticorpi IgA anti-transglutaminasi è stata eseguita con metodica immunoenzimatica a sandwich, processata su sistema ETI MAX 3000. Sono stati considerati negativi i risultati < 7 UA/ml e positivi i valori > 7 UA/ml. I positivi sono stati ripetuti nello stesso campione e confermati su nuovo prelievo, utilizzando anche la ricerca in IFI per gli anticorpi anti endomisio, previa anamnesi accurata.

Risultati: su 183 campioni analizzati, 5 sono risultati positivi ai test sierologici ($P^{\wedge} = 1/36$) e uno solo tra loro (20% dei positivi) presentava sintomatologia.

Discussione e conclusione: L'esame dei risultati ha fatto emergere una prevalenza (sia pure su un campione ridotto) molto elevata per malattia celiaca. Riteniamo importante effettuare indagini di screening su fasce di popolazione giovane per individuare i casi paucisintomatici, atipici o silenti al fine di formulare una diagnosi tempestiva e un precoce trattamento.

Si ringrazia l'Associazione Italiana di Celiachia, sezione Lazio - Viterbo e l'Eurospital per la promozione dell'indagine.

DIAGNOSTICA IMMUNOLOGICA IN VITRO: LA QUALITÀ A CONFRONTO

B-22

S. Loddo, **P. Ballerino**, **G. Sposito**, **A. Valenti**

U.O.C. di Patologia Clinica - Direttore: Prof.ssa Diana Teti; A.O.U. "G. Martino" Policlinico - Messina

Scopo del lavoro. La diagnostica immunologia in vitro sia allergologica che autoimmune non può prescindere da una valutazione critica dei sistemi diagnostici immunoenzimatici disponibili in Italia.

Materiali e Metodi. È stato analizzato il disegno interpretativo generale e statistico dei centri nazionali di verifica cui l'U.O.C. di Patologia Clinica fa riferimento (Centro di Ricerca Biomedica di Castelfranco Veneto, Regione Emilia Romagna Azienda Ospedaliera di Bologna Policlinico S. Orsola - Malpighi, VEQ SIBioC - Prolarit - BioRad dell'Ospedale S. Raffele di Milano).

Risultati. La novità più interessante consiste nella riconsiderazione critica dei parametri di valutazione in base ai quali sfruttare le enormi potenzialità della VEQ in termini di "compliance" e di percezione del miglioramento qualitativo ottenuto su base collaborativa. Al riguardo si segnala che: a) il depliant del Centro di Ricerca Biomedica del corrente anno 2004, tra le novità inserisce: "Elaborazione di profili analitici per le Aziende di Diagnostici" auspicata anche dall'U.O.C. di Patologia Clinica che ha sollecitato tale collaborazione a più livelli. b) il foglio informativo del gruppo di Bologna, nello standard di prodotto relativo all'allergologia, evidenzia i "rilevanti problemi ancora in essere che impediscono una accettabile omogeneità tra sistemi diversi" e chiarisce che "le elaborazioni presentate nel programma di VEQ sono limitate all'interno di ogni metodo/sistema." In altra parte viene dichiarato che "i laboratori ricevono controlli costituiti da singoli soggetti, alcuni dei quali inviati più volte". c) il gruppo di Milano sottolinea, con le informazioni e le notizie contenute nel manuale relativo al 2004 - VI ciclo, che la "partecipazione il più possibile consapevole e attenta" è requisito indispensabile per la corretta gestione della VEQ.

Discussione e Conclusioni. Ne consegue che: a) la sponsorizzazione potrebbe assumere eccessivo rilievo; b) la Verifica Esterna di Qualità secondo gli schemi attuali potrebbe rivelarsi inutile perché sovrapponibile al Controllo di Qualità Interno Allargato da noi proposto al congresso nazionale AIPAC 2001 per altra diagnostica e, c) la partecipazione attenta e consapevole diventa un fattore decisivo e discriminante per la corretta interpretazione e valutazione dei risultati. Dalle considerazioni precedenti emerge che solo una revisione critica delle motivazioni che inducono un'Unità Operativa Complessa a partecipare a programmi di VEQ per la diagnostica immunologica in vitro consentirà un miglioramento continuo della qualità e, soprattutto, il mantenimento della qualità raggiunta.

STUDIO DI UN CASO DI ITP CON ADVIA 120**B-23*****M. Di Quattro¹, M. Gioia², I. Menozzi¹, E Cillari²**¹ Pat. Clinica A.R.N.A.S. Civico Palermo; ² Pat. Clinica, A.O. V. Cervello

Scopo del lavoro. Descrivere la possibilità di utilizzare le informazioni quali-quantitative, fornite dal conteggio piastrinico con metodo ottico, per il monitoraggio del paziente affetto da porpora trombocitopenica immune (ITP).

Materiali e metodi. Nel periodo gennaio-agosto 2004, è stato studiato un paziente, affetto da ITP cronica, diagnosticata dalla Divisione di Ematologia della A.O. "V.Cervello". Il paziente è stato trattato secondo il protocollo GIMEMA. Splenectomizzato e resistente alle immunoglobuline I.V., riprendeva la terapia steroidea (deltacortene 25 mg/die). Poi veniva iniziata la terapia con Vincristina (VCR)(2 mg/w), poi sostituita con azatioprina (AZT) (100 mg/die). L'esame emocromocitometrico è stato eseguito con ADVIA120 (Bayer) su campioni analizzati a 1 ora dal prelievo.

Risultati. I risultati del follow-up del paziente sono riportati nella tabella 1.

Discussione e conclusioni. L'esame emocromocitometrico è un test utile per l'inquadramento dell'ITP. L'iter diagnostico è basato su criteri clinici e sul follow-up terapeutico del paziente. Il profilo piastrinico (in particolare, l'analisi di MPV e il numero delle grandi piastrine), si è rivelato un utile strumento di supporto nel valutare l'efficacia terapeutica, suggerendo informazioni indirette sulla trombocitopenia.

Tabella I. conta piastrine e parametri piastrinici del paziente in esame.

	Conta PLT X10 ³ /ml	MPV fL	MPC g/dL	MPM pg	Grandi PLT X10 ³ /ml	Aggregati PLT
Gennaio 04 Deltacortene	3.0	7.3	24.2	1.8	0	0
Febbraio04 VCR I dose	9.0	13.2	24.8	2.56	12	156
Febbraio 04 VCR II dose	16.0	14.5	27.5	3.11	22	200
Febbraio 04 VCR III dose	288.0	11.0	24.6	2.40	12	180
Marzo 04 AZT	272.0	9.4	28.0	2.41	8	160
Giugno04 AZT	310.0	10.7	26.9	2.30	26	241

VALUTAZIONI CLINICO-METODOLOGICHE DEL DOSAGGIO DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-DSDNA CON IL METODO FLUOROIMMUNOENZIMATICO**B-24****A. Fontana, M. Tampoia, P. Maggiolini, M. Petrelli, D. Centonze, N. Pansini**

Laboratorio di Patologia Clinica I, Policlinico di Bari

Scopo del lavoro: determinare il valore di cut-off ottimale e valutare le performances analitiche del metodo fluoroimmunoenzimatico per la determinazione degli autoanticorpi anti-dsDNA.

Pazienti e metodi: abbiamo valutato 135 sieri: 45 pazienti affetti da LES (42 femmine e 3 maschi, di età media 45, range 20-68), diagnosticati secondo i criteri dell'American College of Rheumatology (ACR), 50 soggetti affetti da altre malattie autoimmuni sistemiche (25 affetti da Sclerodermia, 15 da Sindrome di Sjogren, 10 da Artriti Reumatoide), 20 pazienti affetti da varie infezioni virali e 20 soggetti sani. Il dosaggio degli autoanticorpi anti-dsDNA è stato eseguito con il test EliA dsDNA (Pharmacia, Freiburg, Germany) e con il metodo di immunofluorescenza indiretta su Crithidia Luciliae (Euroimmun,Lubeck, Germany). Le receiver operative characteristic curves (curve ROC) sono state utilizzate per calcolare il valore di cut-off ottimale in base alla casistica da noi selezionata.

Risultati. Il valore di cut-off ottimale riscontrato per la casistica esaminata è stato di 17.7 UI/mL. La sensibilità e specificità del metodo fluoroimmunoenzimatico sono state rispettivamente del 78 % e del 96 %, l' area sotto la curva, AUC, è stata di 0,923. Il valore predittivo positivo (VPP) è stato del 92% , il valore predittivo negativo (VPN) del 89 %. Le concentrazioni autoanticorpali ottenute hanno mostrato valori significativamente differenti tra i pazienti affetti da LES ed il gruppo controllo (ANOVA, F =8.82, P<0.0001). Il metodo di immunofluorescenza indiretta ,eseguito sugli stessi campioni, ha evidenziato una sensibilità del 54% ed una specificità del 98%.

Conclusioni. Il metodo fluoroimmunoenzimatico per la determinazione degli anticorpi anti-dsDNA ha mostrato una sensibilità diagnostica più alta rispetto al metodo di immunofluorescenza indiretta ed una buona specificità. Alle buone performances analitiche aggiunge la maggiore facilità di impiego(automazione) che ne giustifica il sempre maggior utilizzo nei laboratori diagnostici.

UN CASO DI TOXO-IgM ASPECIFICHE IN GRAVIDANZA**B-25****C. Oliviero, A. Vitale, I. Laureti, S. Pepi**

Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda USL7 Poggibonsi, Siena

Introduzione. La toxoplasmosi (Toxo) è una zoonosi causata dal toxoplasma gondii, un parassita intracellulare obbligato delle cellule nucleate degli animali omeotermici (mammiferi ed uccelli). La malattia è molto diffusa ma presenta una bassa morbosità decorrendo per lo più in maniera asintomatica. Clinicamente si distinguono due forme di toxoplasmosi: congenita ed acquisita. La forma congenita è trasmessa dalla madre al feto per via trasplacentare durante la fase parassitemica iniziale e può essere responsabile di aborto, morte fetale, fetopatie manifeste o tardive. Il protocollo regionale della donna in gravidanza prevede il controllo della toxoplasmosi ogni tre mesi: La signora L.B., anni 32 è alla sua seconda gravidanza e si sottopone ai controlli periodici dettati dal protocollo: Toxo-IgG positive, Toxo-IgM negative; ad un mese dal parto le Toxo-IgM si positivizzano.

Materiali e metodi: L'esame della Toxo (IgG ed IgM) e la Toxo IgG Avidity vengono eseguiti con il sistema VIDAS della ditta bioMérieux, si tratta di un sistema immunoenzimatico a cattura e rilevazione in fluorescenza (ELFA). Il test di immunofluorescenza indiretta (IFA-IgM o test di Remington) viene eseguito con il kit della ditta Dasit.

Risultati: Il test Toxo IgG Avidity è risultato negativo (forte avidità) a testimonianza di una infezione contratta, eventualmente, 3-4 mesi prima. Si provvede allora a riprocessare il campione insieme a quello congelato (-40°C) che il mese precedente era risultato negativo per le IgM: i risultati vengono riconfermati. Viene eseguito il test di immunofluorescenza indiretta che risulta negativo.

Discussioni e conclusioni. La negatività della Toxo-IgM in tutti i campioni che hanno preceduto quello incriminato. I valori delle Toxo-IgG, che non presentavano incrementi del loro titolo nel tempo, non erano tali da poter mascherare i siti sterici di legame delle IgM e dare quindi un risultato falsamente negativo all'IFA. La negatività dell'Avidity e dell'IFA, tutto ciò ci ha indotti a pensare alla possibile presenza di IgM aspecifiche, probabilmente sviluppatasi in rapporto allo stato gravidico, in grado di interferire con il metodo ELISA. La bambina, nata un mese dopo, è risultata positiva alla Toxo-IgG (IgG trasmesse dalla madre), ma negativa alla Toxo-IgM. Attualmente madre e figlia non presentano alcun segno clinico ma rimarranno in osservazione per 6-12 mesi. Si deduce che le Toxo-IgM hanno un importante significato di allarme, ma non possono essere considerate un marker certo di fase acuta dell'infezione.

COMPONENTI MONOCLONALI DI ACCOMPAGNAMENTO NELLE PATOLOGIE INFETTIVE ED ONCOLOGICHE**B-26****S. Mangraviti, F. Facco, R. Cozzani, R. Bandettini, L. Pescetto, C. Peri, L. Ricagni, G. Melioli**

Laboratorio Centrale di Analisi Chimico - Cliniche e Microbiologia. I.R.C.C.S. "G Gaslini". Genova.

Scopo del lavoro. In questo lavoro abbiamo studiato la presenza di Componenti monoclonali (C.M.) in un campione di pazienti cui era stata richiesta l'Elettroforesi delle sieroproteine (EFP) nel corso di due anni di osservazione, al fine di valutarne l'incidenza e la tipologia.

Materiali e Metodi. Sono stati studiati 321 soggetti (172 femmine e 149 maschi) di età compresa tra 1 e 93 anni, tutti sottoposti ad approfondimenti mediante Elettroimmunofissazione (IFE) in quanto presentavano aspetti suggestivi di C.M. all'ispezione visiva dell'acetato. I campioni pervenuti al nostro Laboratorio per EFP sono stati sottoposti a determinazione delle Proteine totali e quindi ad Elettroforesi standard e IFE. Per il dosaggio delle Proteine totali di è utilizzato il metodo del Biuretto (Integra Roche). L'Elettroforesi standard è stata eseguita su acetato di cellulosa con analizzatore automatico (Cliniphor 2001 Plus Ampliclinical). La striscia non diafanizzata era quindi sottoposta ad ispezione visiva in transilluminazione. L'Elettroimmunofissazione è stata eseguita su gel di agarosio (HYDRASYS Sebia).

Risultati. 149 soggetti (46 %), di cui 71 maschi e 78 femmine hanno presentato C.M. Nel 54 % dei casi cioè in 172 pazienti (78 maschi e 94 femmine) non sono state evidenziate C.M. Ai fini della tipizzazione e' stato eseguito un totale di 361 IFE ed e' in atto una completa valutazione clinica retrospettiva che sara' complementare al presente studio. Inoltre un campione di 118 pazienti e' stato studiato dettagliatamente tipizzando 170 C.M. che sono risultate cosi' distribuite: 90 IgG kappa (53 %) e 67 IgG lambda (39 %), 1 IgA lambda (1 %), 6 IgM kappa (3.5 %) e 6 IgM lambda (3.5 %).

Conclusioni. Questi dati evidenziano un elevato numero di C.M. e suggeriscono di approfondire sempre lo studio del protidogramma con la tipizzazione di qualsiasi banda anomala che si renda evidente all'ispezione visiva sia all'esordio che durante il decorso della malattia.

**DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-CCP
IN COMPLETA AUTOMAZIONE: CONFRONTO CON IL FATTORE REUMATOIDE**

B-27

M. Tampoia, V. Brescia, P. Maggiolini, M. Petrelli, L. Loiodice, N. Pansini

Laboratorio di Patologia Clinica I, Policlinico di Bari.

Scopo del lavoro: valutare le performances analitiche e cliniche del dosaggio degli anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato (anti-CCP) eseguito in completa automazione.

Pazienti e metodi: abbiamo valutato 173 sieri: 83 di pazienti affetti da AR diagnosticati secondo i criteri dell'American College of Rheumatology (ACR) e 90 controlli di cui 40 pazienti affetti da patologie autoimmuni sistemiche, 30 affetti da epatopatie HCV correlate e 20 soggetti sani. Sugli stessi sieri è stata eseguita la determinazione degli autoanticorpi anti-CCP con test ELISA ImmunoscanRA (Euro-Diagnostica, Svezia) su strumentazione ETIMAX-DiaSorin e la determinazione del Fattore Reumatoide di classe IgM con metodica nefelometrica. Le receiver operative characteristic curves (curve ROC) sono state utilizzate per calcolare i valori di cut-off ottimale in base alla casistica da noi selezionata.

Risultati: la sensibilità e la specificità degli autoanticorpi anti-CCP (cut-off: 25 unità) sono state rispettivamente del 64% (95% CI, 52,8-74,5%) e del 98,2% (95% CI, 90,2-99,7%). L'area sotto la curva, AUC, è stata di 0,746 (95% CI 0,664-0,817). La sensibilità e la specificità del FR (cut-off 12,8 UI/mL) è stata rispettivamente del 64% (95% CI, 52,6-74,1%) ed del 72,7% (95% CI, 59,0-83,9%). L'area sotto la curva, AUC, è stata di 0,805 (95% CI 0,729-0,868). Pertanto i due test hanno mostrato uguali valori di sensibilità, differenti valori di specificità (98,2% anti-CCP versus 72,7% FR) e non hanno evidenziato, quando comparati (DAUC=0,056, 95% CI, -0,034-0,147) differenze significative ($p=0,223$). I pazienti affetti da AR hanno presentato una concentrazione anticorpale media di anti-CCP di 232,6 +/- 428,6 unità, i 40 pazienti affetti da patologie autoimmuni sistemiche una concentrazione anticorpale media di 12,97 +/- 9,98 unità, i 30 pazienti affetti da infezioni virali (HCV) una concentrazione anticorpale media di 11,05 +/- 2,57 con differenze statisticamente significative ($p=0,001$, $F=7,210$). La concentrazione anticorpale media del FR nei pazienti affetti da AR è stata di 118 +/- 236 unità, nei pazienti affetti da patologie autoimmuni sistemiche 16,1 +/- 18,1 nei pazienti affetti da infezioni virali 43,65 +/- 84,64. In questo caso il test di comparazione delle concentrazioni medie di FR ha dimostrato differenze statisticamente meno significative ($p=0,01$, $F=4,1$) rispetto agli autoanticorpi anti-CCP.

Conclusioni: il dosaggio degli autoanticorpi anti-CCP eseguito in completa automazione ha evidenziato buone performances cliniche (sensibilità e specificità) ed una buona associazione con il FR. I risultati ottenuti dal confronto delle medie hanno dimostrato come gli autoanticorpi anti-CCP discriminano meglio i pazienti affetti da AR rispetto al FR.

**ASCA, p-ANCA, PAB e GOBLET-CELLS NELLE PATOLOGIE INFIAMMATORIE
CRONICHE DELL'INTESTINO**

B-28

**R. Faricelli, S. Troiano, G. Filippi, S. Rabottini, S. Esposito, M. Quaranta, V. Dadorante,
S. Gioia, S. Martinotti**

Laboratorio Patologia Clinica Ospedale Clinicizzato "SS. Annunziata"

Scopo: Col termine di patologia infiammatoria croniche dell'intestino si identificano sostanzialmente due patologie: la Rettocolite Ulcerosa (RCU) e il morbo di Crohn (MC). La patogenesi di queste due malattie non è ancora conosciuta, ma si pensa che sia su base autoimmune sia per il tipo di lesione che per la presenza in circolo di autoanticorpi. Lo scopo del lavoro è valutare l'importanza che si ha nel dosare, contemporaneamente, con metodo sierologico tutti gli autoanticorpi implicati nella diagnosi delle patologie infiammatorie croniche dell'intestino, tanto da avere subito un quadro esatto del tipo di malattia.

Materiali e metodi: Gli ASCA IgG-IgA sono stati dosati sia con metodo immunoenzimatico ELISA dalla ditta Menarini che in IFI della ditta Euroimmun; gli anticorpi anti p-ANCA, PAB e cellule caliciformi solo con metodo IFI della ditta Euroimmun. Parte Sperimentale: Abbiamo preso in considerazione 36 pazienti tutti con problemi intestinali non ben definiti. Dopo un primo dosaggio degli ASCA IgG-IgA con metodo ELISA li abbiamo sottoposti ad un dosaggio sempre IgG - IgA in IFI su un vetrino multiplo della ditta Euroimmun. Ciò ha permesso di evidenziare, contemporaneamente, gli ASCA, i p-ANCA, i PAB e le cellule caliciformi tanto da avere un quadro completo del paziente. I pazienti sono stati tutti sottoposti, visto la sintomatologia, ad anticorpi antitransglutaminasi con esito negativo così da escludere la presenza di Morbo Celiaco.

Risultati: Abbiamo evidenziato che vi è una buona corrispondenza tra ASCA in EIA e ASCA in IFI: Positività ASCA IgA 4 in EIA 3 in IFI, Positività ASCA IgG 10 in EIA 8 in IFI. Sei dei pazienti che hanno evidenziato gli ASCA IgG positivi sia in EIA che in IFI tre presentano sul vetrino in IFI una positività per le cellule del pancreas esocrino e quindi sicuramente questi pazienti sono affetti da Morbo di Crohn, tre pazienti presentano sul vetrino in IFI una positività per p-anca e quindi riferibili, come patologia, a RCU. Quattro pazienti non presentano associazione con gli ASCA infatti tre risultano positivi solo per p-anca e uno solo agli anticorpi anti pancreas esocrino in entrambi i casi dovrebbe essere valida l'associazione con le rispettive malattie. Le goblet-cells sono risultate negative su tutti i pazienti, comunque importanti da valutare.

Conclusioni: La presenza in commercio dei vetrini, ditta Euroimmun, che portano adesi quattro tessuti: saccaromices, pancreas, intestino e granulociti neutrofili, con metodo IFI, ci permette di dare al clinico una indicazione diagnostica in più sul tipo di malattia infiammatoria intestinale infatti ci permette di differenziare sierologicamente il MC dalla RCU.

CM, CIC ED INDICI INFIAMMATORI NELLA CARDIOPATIA ISCHEMICA**B-29****F. Bruno***, **M. Ciabatta °**, **G. Imbalzano***, **G. Dicuonzo***, **M. Pellegrinotti****,
C. Maida°, **T. Petitti***, **M. Ruggeri°**

* Policlinico Campus Biomedico Roma; ° A.O. San Giovanni Addolorata Roma; **AUSL Roma G

Scopo del lavoro. Abbiamo osservato come reperto occasionale piccole CM (complesso immune?) all'ispezione visiva del tracciato elettroforetico. Si trattava di pazienti con patologie di varia natura. Una patologia che presenta con una certa frequenza CM, è la cardiopatia ischemica. Visto il ruolo dell'attivazione complementare ed alla luce della teoria infiammatoria-immunologica dell'aterogenesi, abbiamo studiato la correlazione tra la presenza di CM nel tracciato elettroforetico e gli immunocomplessi C1q (via classica del complemento), gli immunocomplessi C3d (via alternativa del complemento) ed alcuni indici infiammatori.

Materiali e metodi. Su 3241 elettroforesi di pazienti (non ematologici) ospedalizzati presso il Policlinico Universitario Campus Biomedico, eseguite nel periodo compreso tra Luglio 2003 e Luglio 2004, 206 (6,4%) tracciati risultavano patologici per la presenza di CM. La quasi totalità dei casi patologici proveniva dalle aree cardiologica (30,6%), oncologica (24,2%) ed immunologica (19%). Le incidenze delle CM in queste aree erano rispettivamente: 6,2%; 6,3% e 7,8%. Su 63 sieri di cardiopatici, abbiamo proceduto all'identificazione e tipizzazione delle CM (Hydrasys Sebia); alla quantificazione delle IgG, IgA, IgM, kappa, lambda e rapporto kappa/lambda (BNII Dade Behring); alla quantificazione delle PCR, SAA, TAS, alfa1-glicoproteina acida (LX 2200 Alfa Wassermann); alla determinazione di CIC C1q (BNII Dade Behring) e CIC C3d (Elisa IPR).

Risultati. Dei 63 sieri con cardiopatia ischemica, 48 presentavano CIC (76,19%) all'immunoelettroforesi. Negli stessi la frequenza di positività delle proteine infiammatorie risultava: TAS 7/63, SAA 28/63, alfa1-glicoproteina acida 24/63 e PCR 16/63. Il rapporto kappa/lambda risultava sbilanciato in 37 casi su 63; il CIC C1q positivo in 10 casi su 63 ed i CIC C3d in 5 su 63. In totale la presenza di almeno un indice infiammatorio positivo si è ritrovata in 38 su 63 CM ed in 32 su 48 CIC. L'analisi univariata con il metodo esatto di Fisher ha dato un O.R. di 3 (I.C. 0,79-11,75) con una $p = 0,07$ per la presenza di almeno un indice infiammatorio positivo e CIC.

Discussione e conclusione. Pur non raggiungendo questi dati la significatività statistica, essi indicano che la correlazione studiata può diventarlo con un campione più esteso. Da quanto su esposto risulta rafforzata l'ipotesi infiammatoria della cardiopatia ischemica ed in particolare la presenza di CIC come fattore di rischio indipendente.

SPECIFICITÀ E SENSIBILITÀ DEI MARKERS SIEROLOGICI (AGA, EMA Eu-t TG) DI MALATTIA CELIACA**B-30****AM. Fasani, S. Caroli, A. Cogrossi, M. Frassi, E. Manfredini**

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia. AO "Istituti Ospitalieri Cremona"

La Malattia Celiaca è una enteropatia caratterizzata dalla atrofia dei villi intestinali, iperplasia delle cripte ed aumento dei linfociti intraepiteliali in seguito alla assunzione di glutine con gli alimenti.

E' una delle patologie autoimmuni più comuni nei paesi occidentali. L'incidenza in Europa varia da 0,3 a 1 % nella popolazione generale. La diagnosi si effettua con tecniche invasive, basate sul prelievo istologico di tessuto intestinale che rappresentano il metodo diagnostico di riferimento e tecniche non invasive su sangue periferico.

Scopo del lavoro: determinare la sensibilità e la specificità della diagnosi sierologica di malattia celiaca e l'applicabilità nella pratica clinica.

Materiali e metodi: Su un totale di 1475 pazienti afferenti al laboratorio analisi dell'ospedale di Cremona dal gennaio 2003 all'agosto 2004, sono stati selezionati 116 casi (67 F, 49 M) di soggetti sottoposti a screening sierologico completo per la diagnosi di malattia celiaca e risultati positivi a uno o più test con l'esclusione dei soggetti celiaci in follow-up. Dei 116 pazienti, 29 erano stati sottoposti a biopsia intestinale. I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi di età:

1° gruppo - 27 casi (13 F, 14 M) fino a 3 anni.

2° gruppo - 47 casi (28 F, 19 M) da 3 a 10 anni

3° gruppo - 42 casi (26 F, 16 M) oltre 10 anni (range 10 - 74 anni)

Sono stati utilizzati test immunoenzimatici per la determinazione degli anticorpi anti-? gliadina AGA IgA e IgG; anti-transglutaminasi tissutale Anti-tTG IgA, e test in immunofluorescenza indiretta su vetrino per la determinazione qualitativa degli anticorpi antiendomisio EMA IgA (Eurospital, Trieste). E' stata valutata la sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo e negativo (VPP e VPN) : confrontato con la diagnosi istologica.

Risultati: Sul totale di 116 pazienti 18 presentavano positività per EMA ed Anti-tTG e 19 risultavano positivi alla diagnosi istologica con una specificità e sensibilità pari al 94,7%.

Nell'analisi differenziata per fascia di età si evidenzia:

Nel primo gruppo una specificità del 100% per EMA ed Anti-tTG. AGA specificità pari al 55,6%,

Nel secondo gruppo una specificità dell'80% per EMA ed Anti-tTG. AGA specificità pari al 40,5% e sensibilità del 20%.

Nel terzo gruppo: specificità e la sensibilità del 100% per anti-tTG IgA ed EMA IgA che consentono di considerare questi test come test di elezione per la diagnosi di celiachia con VPP e VPN del 100%.

Conclusioni: Il confronto tra i dati sierologici ed istologici evidenzia una buona concordanza dei risultati ed il possibile utilizzo dei test Eu-tTG ed EMA nell'iter diagnostico di malattia celiaca in tutte le fasce di età.

L'ASSOCIAZIONE DI ANTICORPI ANTI-RA33 E ANTI-CCP2 AUMENTA LA SENSIBILITÀ DIAGNOSTICA PER L'ARTRITE REUMATOIDE

B-31

N. Bizzaro, G. Marcon, P. Pasini

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile di San Donà di Piave (VE)

Scopo del lavoro. Gli anti-RA33 sono autoanticorpi associati all'artrite reumatoide (AR), nei confronti della quale hanno una sensibilità diagnostica attorno al 20%. Pur non essendo anticorpi AR-specifici, potendosi riscontrare nel 25% dei soggetti con LES e altre connettiviti, sono tuttavia presenti nel 30% dei soggetti AR con negatività per il fattore reumatoide (FR) e compaiono in fase molto precoce di malattia. Rilevati classicamente solo con metodi di immunoblot, di recente si sono resi disponibili metodi ELISA che ne consentono la misurazione quantitativa in casistiche più ampie. Abbiamo perciò valutato un nuovo metodo ELISA studiando una popolazione di pazienti con diagnosi di AR ben definita e confrontato i risultati con quelli ottenuti nella determinazione degli anticorpi anti-CCP2 e del FR.

Materiali e metodi. Anticorpi anti-RA33 sono stati ricercati nel siero di 62 pazienti con AR e di 26 con malattie del connettivo (13 LES, 12 Sjögren e 1 polimiosite). Il test è stato eseguito con metodo ELISA (Imtec, Berlino, Germania) che utilizza antigene ricombinante umano e una curva di calibrazione su 5 punti. Il cut-off è stato posto a 25 unità arbitrarie, secondo le indicazioni del produttore. I risultati sono stati correlati con quelli ottenuti in precedenza sulla stessa popolazione per anti-CCP2 e FR.

Risultati. Dei 62 pazienti con AR, 31 sono risultati anti-RA33 positivi, 39 anti-CCP2 positivi e 36 FR positivi. 6 pazienti sono risultati negativi per tutti gli anticorpi. Nel gruppo di controllo i positivi sono stati 9 per RA33, 1 per CCP2 e 12 per FR. La sensibilità è stata perciò 50% per RA33, 63% per CCP2 e 58% per FR; la specificità, 65% per RA33, 96% per CCP2 e 58% per FR. Dei 56 pazienti AR che presentavano almeno un anticorpo positivo, 14 (25%) erano solo anti-RA33 positivi, 6 (11%) solo anti-CCP2 positivi e 2 (3%) solo FR positivi.

Conclusioni. Questo studio ha confermato che, globalmente, gli anti-RA33 sono dotati di scarsa sensibilità e specificità per la diagnosi di AR. Tuttavia, 14 pazienti su 56 (25%) sono risultati positivi solo per questo anticorpo e negativi per anti-CCP2 e FR, indicando che esiste un sottogruppo di pazienti che può essere individuato solo con questi anticorpi. La associazione di anti-RA33 e anti-CCP2 ha dimostrato una sensibilità del 87.3% nell'individuare i soggetti affetti da AR. L'aggiunta del FR ha migliorato la sensibilità solo del 3%. Poiché ambedue gli anticorpi compaiono nelle fasi iniziali di malattia, il loro uso combinato potrebbe essere clinicamente importante nella diagnosi precoce di AR.

EVIDENZA DI ISOLATA POSITIVITÀ PER ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI DI CLASSE IgG IN SOGGETTI CELIACI SENZA DEFICIT DI IgA: UN'ALTRA FACCIA DELL'ICEBERG CELIACO

B-32

E. Tonutti^a, D. Visentini^a, N. Bizzaro^b

^aImmunopatologia-Allergologia, Azienda Ospedaliera S.Maria della Misericordia, Udine.

^bLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di S. Donà di Piave

Scopo dello studio. È nota l'alta prevalenza del morbo celiaco (MC) nei soggetti con deficit assoluto di IgA nei quali si riscontrano elevati livelli di anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG) IgG che, in questi casi, rivestono un sicuro ruolo patogenetico. Recentemente è stata inoltre segnalata l'esistenza di soggetti celiaci senza deficit di IgA, negativi per anti-tTG IgA ma positivi per anti-tTG IgG. Per verificare questa possibilità e per valutarne la prevalenza, per un anno abbiamo eseguito i test anti-tTG IgA e IgG a tutti i pazienti inviati ai nostri Laboratori per sospetta MC.

Materiali e metodi. I test sono stati eseguiti con metodo ELISA (Eurospital, Trieste) secondo le istruzioni del produttore. In presenza di positività isolata per anti-tTG IgG, è stata effettuata la determinazione nefelometrica delle IgA totali e in caso di normali livelli di IgA sieriche è stata consigliata l'esecuzione della tipizzazione HLA DQ2/DQ8. Ai pazienti positivi all'aplotipo è stata consigliata l'esecuzione della biopsia duodeno/digiunale.

Risultati. Dei 3.323 pazienti studiati, 103 (3.1%) sono risultati anti-tTG IgA positivi. 82 di questi erano anche EMA positivi, tutti confermati celiaci sulla base del risultato della biopsia intestinale. Dei 21 anti-tTG IgA positivi ma EMA negativi, 3 erano celiaci in dieta priva di glutine, 5 sono risultati veri celiaci (HLA e biopsia positivi), 3 non celiaci (biopsia negativa) e per 10 il follow-up è in corso. Anticorpi IgG anti-tTG sono stati trovati in 103 soggetti su 3.323, 17 dei quali erano positivi anche alle IgA anti-tTG (tutti 17 poi diagnosticati affetti da MC) mentre 86 erano reattivi alle sole IgG anti-tTG. Di questi, 10 erano soggetti celiaci in dieta priva di glutine e 2 sono risultati celiaci con deficit di IgA. Degli altri 74 pazienti, 7 si sono negativizzati nel follow-up, 21 sono risultati HLA negativi e 18 positivi; in 6 di questi (8%), la biopsia intestinale ha confermato la diagnosi di MC. 16 pazienti hanno rifiutato ulteriori indagini e per i restanti 12 il follow-up è ancora in corso.

Discussione e conclusioni. I nostri dati indicano che nella maggior parte dei casi la positività isolata per IgG anti-tTG è da considerarsi un pattern autoanticorpale aspecifico; c'è però un ridotto numero di pazienti con MC in atto, senza deficit di IgA, che è anti-tTG IgA negativo e IgG positivo. Pertanto, un corretto approccio alla diagnosi di MC deve prevedere l'esecuzione anche di anti-tTG IgG con la eventuale determinazione dell'aplotipo DQ2/DQ8 nei positivi, nei pazienti in cui sia presente un consistente sospetto clinico di MC.

LA PROTEINA C-REATTIVA ULTRASENSIBILE NELLE SINDROMI CORONARICHE ACUTE**B-33****P. Chiarugi, A. Miele, L. Papotto**

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche 1°, Azienda Ospedaliera Pisana, Pisa

Scopo del lavoro. Un numero sempre maggiore di lavori mostra che la proteina C-reattiva (PCR) è un fattore di rischio per malattie cardiovascolari. Per questo tipo di valutazioni le tradizionali metodiche di dosaggio non hanno sensibilità analitica adeguata ma sono necessari metodi immunochimici ultrasensibili (la cosiddetta PCR ultrasensibile o hs-PCR). Scopo della nostro studio è stato quello di dimostrare l'utilità clinica a fini prognostici del dosaggio di hs-PCR in un gruppo di pazienti affetti da sindrome coronaria acuta (SCA).

Materiali e metodi. Sono stati arruolati 42 pazienti consecutivi, ricoverati per SCA in UTIC. Su ciascun paziente è stato eseguito un prelievo di sangue all'ammissione ed uno prima della dimissione per il dosaggio dell'hs-PCR. A tale scopo è stato utilizzato lo strumento Kryptor (fornitoci dalla Dasit S.p.A) che usa l'innovativa tecnologia TRACE basata su un trasferimento di energia non radiante. Da un punto di vista clinico, per effettuare una classificazione dicotomica su base prognostica dei soggetti esaminati, sono stati valutati end-point combinati basati su gravità della coronaropatia, funzione ventricolare sinistra, complicanze durante il ricovero ed eventi sfavorevoli a 30 giorni. Per valutare il grado di concordanza fra i risultati del dosaggio di PCR e la classificazione dei pazienti con SCA su base clinica e per individuare il cut-off ottimale da utilizzare come discriminante fra i due gruppi, è stato utilizzato il metodo della curva ROC. Nei due gruppi così ottenuti è stato calcolato il rischio relativo con intervallo di confidenza del 95%.

Risultati. Si nota una netta differenza tra il dosaggio di PCR all'ammissione e quello alla dimissione, con un incremento di valori da una media di 23,67 mg/l a una di 55,15 mg/l ($p < 0,001$). La valutazione degli end-point clinici ha permesso di distinguere, sulla base dell'osservazione di almeno un evento, due sottogruppi di pazienti con SCA: quelli con decorso complicato e quelli con decorso non complicato. L'analisi del cut-off ottimale di PCR all'ammissione in funzione dell'evento clinico eseguito con la curva ROC ha condotto ad un valore di 5,5 mg/l a cui corrisponde una sensibilità ed una specificità rispettivamente di 80,6% (62,5-92,5) e di 72,7% (39,1-93,7). L'area sotto la curva è risultata 0,795 (0,642-0,903). Sulla base di questo cut-off è stato calcolato un rischio relativo di sviluppare un decorso complicato pari a 2,08 (1,12-3,86).

Discussione e conclusioni. Il nostro studio si è delineato come esperienza preliminare nel contesto di una valutazione del ruolo della PCR come indicatore prognostico nelle SCA, ruolo che richiede l'osservazione di un adeguato periodo di follow-up dei pazienti esaminati. Ma anche se la nostra esperienza si è limitata allo studio del decorso clinico durante il ricovero, risulta significativo che nei pazienti con SCA un valore basale di PCR superiore 5,5 mg/l sia associato ad una più grave situazione clinica. Poiché i livelli di PCR aumentano sensibilmente durante il ricovero, per la valutazione del rischio il prelievo all'ammissione è più utile di quello alla dimissione, ed è necessaria una metodica di dosaggio ultrasensibile per garantire un'adeguata precisione analitica a queste concentrazioni.

VALORI DI RIFERIMENTO DELLA VES CON LO STRUMENTO TEST 1**B-34****P. Chiarugi, A. Miele, E. Marasti, G. Gasparri**

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche 1°, Azienda Ospedaliera Pisana, Pisa

Scopo del lavoro. Valutare i valori di riferimento, distinti per sesso e fasce di età, dopo l'introduzione nel nostro laboratorio di un nuovo strumento per la VES (Test1, Alifax S.p.A) che utilizza per la sua misura sangue non diluito in provette con K3EDTA e determina la sedimentazione degli eritrociti con tecnica di microfotometria capillare.

Materiali e Metodi. La nostra popolazione di riferimento consiste in 1195 soggetti (483 maschi e 712 femmine di età compresa fra 3 e 95 anni, mediana 58 anni) afferenti al Centro Prelievi del nostro laboratorio nell'arco di tempo di 40 giorni consecutivi. I campioni di sangue venoso, raccolti in condizioni standardizzate in K3EDTA, furono analizzati entro 4 ore dal prelievo, sull'apparecchio automatizzato Test1 che richiede 200 mL per campione e fornisce un risultato ogni 32 secondi circa. I dati sono stati analizzati suddividendoli in quattro gruppi in base al sesso ed all'età superiore o inferiore ai 50 anni, e sottoponendoli all'Analisi della Varianza, il test di Scheffé e il test di Mann-Whitney per le distribuzioni non normali. L'analisi statistica per calcolare i valori di riferimento è stata condotta in accordo alle raccomandazioni dell'IFCC e dell'ICSH.

Risultati. I dati ottenuti presentano una distribuzione molto asimmetrica verso sinistra che non è conforme a quella gaussiana neanche dopo trasformazione logaritmica, pertanto i valori di riferimento sono stati calcolati coi metodi non parametrici considerando, in virtù della particolare forma di distribuzione, l'intervallo fino al percentile 95° e non quello centrale fra i percentili 2,5 e 97,5. Con il Mann-Whitney U test sono state rivelate differenze statisticamente significative sia fra maschi e femmine, sia fra soggetti di età inferiore e superiore a 50 anni ($p < 0,0001$). I risultati, comprendenti il tipo di gruppo, la numerosità e il 95° percentile della VES, sono così sintetizzabili. Maschi <50 (179): 17; Maschi >50 (305): 36,8; Tutti i maschi (483): 29; Femmine <50 (232): 33,45; Femmine >50 (480): 43; Tutte le femmine (712): 39.

Discussione e Conclusioni. La determinazione della velocità di eritrosedimentazione, nonostante sia un test di laboratorio non specifico è ancora considerato un affidabile marcatore di flogosi. I valori ottenuti con l'analizzatore automatizzato Test1 sono più alti rispetto a quelli tradizionali ottenuti col metodo di riferimento di Westergren al quale però sono strettamente correlati. Pertanto è necessario cambiare i propri valori di riferimento quando si passa dal metodo tradizionale a quello nuovo, distinguendoli per sesso e per età come dimostrano i risultati del nostro lavoro.

CITOCINE E PROCALCITONINA NEL PAZIENTE CRITICO**B-35****M. Vitillo, V. Magliocca, F. Cortese *, L. Cuomo, S. De Santis, AO. Di Gregorio, S. Sette, L. Vitolla, S. La Rocca**

UOC Patologia Clinica e *UOC Chirurgia d'Urgenza, ACO S.Filippo Neri, Roma

Scopo del lavoro è quello di verificare le concentrazioni di alcune citochine (Interleuchina 1-beta - IL1b, Interleuchina 6 - IL6, Interleuchina 8 - IL8, Tumor Necrosis Factor alfa - TNFa), mediatori della infiammazione, e della procalcitonina (PCT), indicatore precoce di sepsi, nei pazienti con Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS) determinata da politrauma o sepsi.

Materiali e Metodi: Sono stati inclusi nello studio 21 pazienti con politrauma grave o sepsi che mostravano segni di SIRS (età media 45, DS. 19, 15 maschi e 6 femmine). E' stato effettuato almeno un dosaggio di IL1b, IL6, IL8, TNFa e PCT, nonché la conta dei bianchi (WBC). Per molti pazienti i dosaggi sono stati ripetuti durante il decorso. I dosaggi sono stati effettuati in immunochemiluminescenza (IL1b, IL6, IL8 e TNFa: Immulite One, Medical Systems. PCT: luminometro Berthold, LUMItest PCT Brahms, DASIT). La conta di WBC è stata effettuata su contaglobuli SYSMEX SE9500, DASIT.

Risultati: Il valore medio di ciascun analita nei pazienti esaminati è risultato: IL1b (pg/ml)=18,8 (DS=119,9), 7,2% di patologici (>5); IL6 (pg/ml)=45,2 (DS=105,1), 87,5% di patologici (>4,1); IL8 (pg/ml)=78,2 (DS=190,8), 29,4% di patologici (>62); TNFa (pg/ml)=26,3 (DS=118,4), 64,3% di patologici (>8,1); PCT (pg/ml)=1,52 (DS=2,7), 44,4% di patologici (>0,5); WBC ($10^3/u$)=14,8 (DS=7,5), 67,2% di patologici (>10). I valori delle citochine, della PCT e di WBC in ciascun prelievo sono risultati scarsamente correlati tra loro (R^2 sempre <0,03). I valori di IL6 sono risultati mediamente più elevati nei 6 pazienti deceduti rispetto ai 15 sopravvissuti. Utilizzando un cut off di 120 pg/ml la sensibilità (Se) del test come predittore di esito infausto è 1,00, la specificità (Sp) 0,80, il valore predittivo positivo (VPP) 0,67, il valore predittivo negativo (VPN) 1,00. La PCT ha dimostrato minore efficacia diagnostica: utilizzando un cut off di 1,5 pg/ml la Se del test come predittore di esito infausto è 0,83, la Sp 0,80, il VPP 0,56, il VPN 0,91.

Discussione e Conclusioni. L'esame di questi dati preliminari dimostra che le concentrazioni delle citochine e della PCT non risultano tra loro correlate, forse perché nel decorso della SIRS intervengono meccanismi patologici differenti e variabili. In ogni caso i valori delle citochine e della PCT risultano mediamente elevati nel gruppo di pazienti in esame. Il miglior predittore di esito infausto è risultato il dosaggio della IL6: utilizzando come cut off il valore di 120 pg/ml, un risultato negativo esclude la possibilità di esito infausto (VPN=1,00). La PCT è risultata meno efficace, probabilmente perché in parte dei pazienti la SIRS risultava conseguenza di sepsi, mentre negli altri di politrauma. Gli altri test hanno dimostrato scarsa efficacia prognostica.

COMPARABILITA' DELLA DETERMINAZIONE DI IGE SPECIFICHE VERSO IL LATTICE IMPIEGANDO UNICAP 100 ED ADVIA CENTAUR**B-36****N. Lerose, B. Caruso, N. Melloni, A. Ferrari, RM. Dorizzi, P. Rizzotti**

Laboratorio Analisi, OCM, Azienda Ospedaliera di Verona

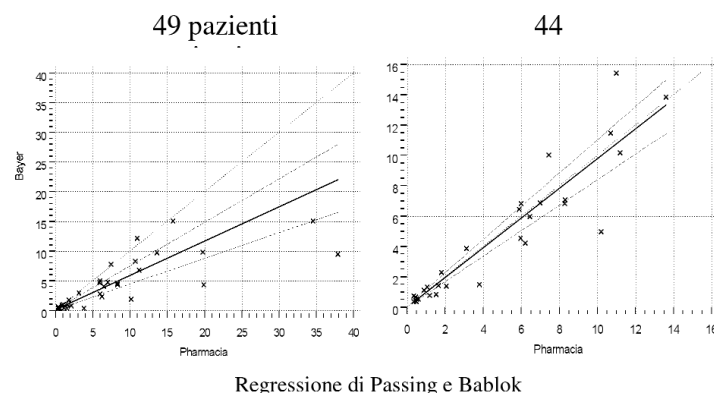
Scopo del Lavoro. A partire dagli anni 80 l'allergia al lattice è stata riconosciuta negli operatori sanitari con frequenza sempre maggiore. Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare la comparabilità dei risultati dell'analizzatore Unicap 100 con quelli di Advia Centaur.

Materiali e Metodi. La concentrazione di IgE contro il lattice è stata misurata con Unicap 100 (CAP) e con Advia Centaur (Centaur) in 49 campioni.

Risultati. La concentrazione ottenuta con i due analizzatori è risultata: CAP: intervallo= 0.35-37.9 KU/L; media= 5.54 KU/L; mediana=1.54 KU/L; Centaur: intervallo= 0.35-15.0 KU/L; media= 3.05 KU/L; mediana= 0.76 KU/L. La correlazione è risultata: $r = 0.82$ ($n=49$) e 0.894 non considerando i 5 campioni a

concentrazione più alta. La regressione di Passing Bablok è risultata rispettivamente: Bayer=0.148 + 0.577 CAP ($n=49$) e Bayer=0.118 + 0.661 CAP ($n=44$). La classificazione è risultata uguale per 44/49 pazienti (4 discordanze: CAP +/Centaur -; 1 discordanza: CAP-/Centaur+).

Discussione e conclusioni. La confrontabilità dei valori numerici e la classificazione dei soggetti sono risultate soddisfacenti anche se si deve considerare la probabilità pre-test della diagnosi.



IL RUOLO DEL LABORATORIO DI ALLERGOLOGIA NELLA VALUTAZIONE DI UN QUADRO CLINICO INCONSUETO

B-37

A. Carbonieri[&], A.T.Scacchetti[&], C.Vecchi[§]

[&] Laboratorio Analisi Chimico Cliniche

[§] Servizio di Medicina TrASFusionale - Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico di Modena

Premessa: I cambiamenti della sanità in ambito locale e nazionale impongono una revisione dei ruoli delle diverse figure professionali e con esse anche dei servizi in cui tali figure operano. Le attività che devono essere sempre più sviluppate, in particolare dalle aree specialistiche, sono quelle rivolte alla appropriatezza dei percorsi diagnostici e alla interpretazione dei risultati per arrivare a svolgere un ruolo di consulenza ordinaria e straordinaria.

Scopo del lavoro: presentare un caso interessante in cui il ruolo di consulenza dei professionisti di laboratorio è stato determinante per la felice conclusione del caso.

Materiali e metodi: Lo scorso anno si è presentata presso il Servizio di Medicina TrASFusionale, una paziente di anni 78 per un predeposito in previsione di un intervento all'anca. A distanza di un'ora dall'inizio la paziente presentava eritema diffuso agli arti, associato ad epigastralgia. Il nostro laboratorio di allergologia in vitro, chiamato in consulenza per verificare l'ipotesi di una verosimile reazione allergica, esaminata l'anamnesi della paziente (episodi di orticaria acuta dal '97 in relazione con l'assunzione di pomodoro, banana, carne di maiale e una reazione allergica al gel dopo esecuzione di ecoaddome), ha formulato l'ipotesi suggestiva di una probabile cross-reazione tra il lattice e la banana: la paziente aveva avuto un contatto solo con la sacca per autotrasfusione e dall'anamnesi emergeva la relazione tra l'assunzione della banana e eruzioni cutanee. La sacca in oggetto era però costituita interamente da componenti latex free, tranne il cappuccio copri ago (lattice naturale). La paziente aveva eseguito in altra sede una serie di esami in vivo e vitro: la banana non era stata indagata.

Risultati: Sono state tempestivamente ricercate le IgE specifiche per il lattice e gli allergeni con i quali crocia tale allergene tra cui la banana. I risultati hanno dato esito positivo: k82 Lattice= 5,88 KuA/l; f92 Banana= 0,56 KuA/l. L'ipotesi di probabile cross-reazione tra il lattice e la banana era fondata. La paziente poteva subire l'intervento all'anca solo in sale operatorie attrezzate (latex free).

Conclusioni: Questo episodio suggerisce due considerazioni degne di nota: 1) è un esempio di fruttuosa collaborazione nata dal colloquio fiducioso tra Servizi Interdipartimentali, in cui il laboratorio non assume un ruolo passivo ma interviene in maniera propositiva e strutturata; 2) valenza importantissima riveste l'anamnesi preoperatoria allo scopo di identificare i soggetti a rischio; in alcuni centri Ospedalieri è stata adottata la ricerca delle IgE specifiche e Skin test nei casi di dubbia atopia.

INTRODUZIONE DEI TEST DI SCREENING COME MARCATORI DI ATOPIA NELLA GESTIONE DELLA DIAGNOSTICA ALLERGOLOGICA IN VITRO: COSTO-BENEFICIO DELLE PERFORMANCE ANALITICHE ED ORGANIZZATIVE

B-38

AT. Scacchetti, C. Canali, R. Roncaglia, A. Carbonieri

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico di Modena

Premessa: Negli ultimi anni si è assistito ad una evoluzione nelle tipologie di richieste per la ricerca di IgE Specifiche in vitro: le richieste non mirate provenienti dagli specialisti (RNMS) sono aumentate a discapito delle richieste mirate specialistiche (RMS) e di quelle provenienti dal Medico di Medicina Generale (RMMG). Parallelamente si è registrato un incremento del numero di accessi e di allergeni testati, con una percentuale di risultati non significativi nelle RMS (80%), nonostante l'adozione di linee guida e pannelli concordati con i clinici.

Scopo del Lavoro: individuare percorsi alternativi per fare fronte in modo adeguato all'impatto delle RNMS, garantendo il completamento dell'iter diagnostico per i pazienti positivi.

Materiali e Metodi. Dopo avere analizzato i dati relativi alla diagnostica allergologica in vitro dal 1977 al 2002 nella nostra realtà (n° di richieste esami, tipologia delle stesse, n° di allergeni saggiati, percentuale di risultati significativi e tempi di risposta), nel 2003 abbiamo implementato due test di screening per evadere le RNMS. I tests adottati utilizzano la tecnologia Immucap Pharmacia per il dosaggio qualitativo in vitro (siero/plasma) degli anticorpi IgE allergene specifici. Il Phadiatop Infant, applicato nella fascia d'età da 0-4 anni, è costituito da una miscela bilanciata di allergeni alimentari ed inalanti (sensibilità = 95% e specificità = 86%). Il Phadiatop, suggerito oltre i 5 anni, è una miscela di allergeni inalanti (sensibilità = 96% e specificità = 89%).

Risultati. Sono stati testati 747 pazienti con diagnosi dubbia all'anamnesi associando allo screening il micofita Alternaria Alternata (allergene poco espresso in queste miscele) per aumentare la sensibilità del sistema diagnostico. Sui risultati negativi (62%) l'iter veniva concluso; sui positivi (38%) si è indagato testando gli allergeni per l'identificazione e la conferma. Dal confronto tra i due periodi è emersa: una diminuzione dell'uso indiscriminato degli allergeni, una riduzione di spesa, una contrazione delle liste di attesa e dei tempi di risposta.

Discussione e conclusione. In un panorama che muta velocemente come quello della diagnostica di laboratorio, la capacità di adeguare gli strumenti e le risorse a disposizione alle nuove esigenze è un requisito fondamentale e indispensabile per un uso appropriato delle risorse. Altrettanto importante è la validazione da parte dei clinici dell'impiego di questi test di screening attraverso la presentazione dei risultati in incontri con MMG, PDLS e MS, affinché venga garantita una prestazione appropriata fin dal momento iniziale della prescrizione.

**VALUTAZIONE DEL SISTEMA "REALTEST" (DELTA BIOLOGICALS)
NELLA DIAGNOSI DI ALLERGIA ALIMENTARE**
B-39
AT. Scacchetti, C.Canali, A. Carbonieri

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche-Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Modena

Premessa: Per fare diagnosi di allergia alimentare è necessario dimostrare sia direttamente che indirettamente (prove cutanee) la presenza di IgE specifiche verso gli antigeni alimentari. Dato il crescente numero di sostanze da testare, ciascuna con proprie caratteristiche antigeniche, i sistemi analitici in uso devono essere continuamente adeguati e/o integrati per garantire elevati livelli sensibilità e specificità diagnostica sull'intera gamma degli allergeni da testare.

Scopo del lavoro: Valutare le performance diagnostiche del sistema diagnostico MagoPlus (Delta Biologicals)

Materiale e metodi: Lo studio è stato condotto su una popolazione di 81 pazienti (44 femmine e 37 maschi) di età compresa fra 2 e 58 anni, comprendente casi con anamnesi positiva e/o prick test positivi per alimenti ma IgE specifiche negative, casi con IgE specifiche positive o negative confermati dalla clinica, pazienti con IgE specifiche positive per alimenti ma asintomatici e individui sani non atopici. Sono state testate le IgE Specifiche per: albume (F1), latte (F2), pesce (F3), grano (F4), pisello (F12), arachidi (F13), pomodoro (F25), scampi o gamberi (F24) su "UniCAP-Pharmacia", in uso routinario, e su "Realtest" MagoPlus (Delta Biologicals) che utilizza la tecnica REAST (Reverse Enzyme Allergo Sorbent Test), metodo ELISA che presenta il vantaggio di testare contemporaneamente, con lo stesso metodo di cattura, sia le IgE specifiche che le IgE Totali e quindi di fornire la percentuale di concentrazione di IgE allergene-specifiche (densità), che è correlata al rilascio di mediatori dalle cellule con recettori per IgE ed alla presunta gravità clinica della sensibilizzazione.

Risultati: Si è evidenziata una percentuale significativa di pazienti, negativi ai tests in uso, ma positivi ai tests in valutazione, che sulla base di questi dati possono essere recuperati in un quadro complessivo di atopia: è il caso degli allergeni F1, F2, F4 (percentuali di risposte positive dal 16% al 50%). In questi casi sarà necessario eseguire indagini supplementari per confermare la validità del metodo in prova. La correlazione della percentuale della densità con le IgE Totali attesta una soddisfacente linearità: l'adozione di un cut-off potrebbe essere utile per evidenziare la presunta gravità clinica in relazione a questa ulteriore indicazione.

Conclusioni: Possiamo considerare questo lavoro come la prima parte di uno studio che si propone di indagare su un ampio numero di pazienti per singolo alimento ma soprattutto ci induce a proseguire nella conferma delle positività ottenute che, se validate, aprono ulteriori prospettive per la integrazione del sistema esaminato nella realtà di un laboratorio di diagnostica allergologica in vitro.

IL TEST COMBINATO NELLA DIAGNOSI PRENATALE DELLA SINDROME DI DOWN
C-01
M. Carta, A. Fortunato, P. Catapano, G. Soffiati

Laboratorio di chimica clinica ed ematologia; Divisione di Ostetricia e Ginecologia - Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

Scopo del lavoro. Il test combinato ha dimostrato in studi recenti una buona detection rate (89%) con 5% di falsi positivi (Spencer K, Ultrasound Obstet Gynecol 1999;13:231-7). Dal 2001 il nostro laboratorio propone questo test come screening per la sindrome di Down.

Materiali e metodi. Il test combinato si basa sulla combinazione della misurazione della translucenza nucale (STN) (raccolta di fluido compresa tra la cute e la colonna cervicale del feto), il dosaggio di due parametri biochimici materni, free b hCG e proteina A plasmatica associata alla gravidanza (PAPP-A) (Immulate 2000 DPC, Los Angeles, CA) e l'età materna. Il modello statistico utilizzato per l'elaborazione del calcolo è quello ideato dalla FMF (Fetal Medical Foundation). L'esame viene eseguito nel primo trimestre di gravidanza, in stretta collaborazione tra ginecologia e laboratorio.

Risultati. Dal dicembre 2001 ad agosto 2004 sono stati eseguiti 1635 test combinati. Di questi sono risultati positivi 102 test (6.2%) (cut off 1:300). 38 tra le pazienti positive hanno eseguito approfondimento diagnostico (amniocentesi o villocentesi). Tra queste 9 pazienti presentavano un feto con trisomia (8.8%) e 1 sindrome di Turner. Una paziente con carioripo riferito normale partorì una bambina con sindrome di Cornelia de Lange. Tra le pazienti che scelsero di non approfondire, 44 pazienti partorirono un feto sano, 2 abortirono spontaneamente, uno in 16 settimane, l'altro in 6 mesi. Per altre 18 pazienti la gravidanza è ancora in corso. Una paziente con test combinato alterato scelse di non approfondire e partorì un bambino con trisomia.

Conclusioni. Il test combinato ci ha permesso di riconoscere 10 casi di trisomia in 1635 pazienti e 1 caso di sindrome di Turner. Limitando l'analisi alle 1508 pazienti sottoposte a screening entro febbraio, su cui disponiamo di dati completi, i falsi positivi sono stati 73 (4,8%). Due pazienti hanno abortito ma non disponiamo del cariotipo fetale. Tali dati sono coerenti con i dati disponibili in letteratura. Al momento non abbiamo avuto riscontro di falsi negativi e quindi abbiamo diagnosticato il 100% delle anomalie.