

Concentrazioni plasmatiche dei prodotti dell'ossidazione proteica avanzata: stabilità durante la conservazione del campione e correlazione con altri parametri clinici

Ceccarelli L., Lucchetti A., *Quilici S., *Cinapri V., *Matteucci E., *Giampietro O., Innocenti B., Rossi L.

Laboratorio Analisi Chimiche e Microbiologiche 1, Azienda Ospedaliera Pisana
*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa

Scopo del lavoro

Anche le proteine subiscono il danno ossidativo e possono andare incontro a modificazioni strutturali e funzionali. L'ossidazione delle proteine plasmatiche è stata quantificata mediante un marcatore di stress ossidativo (advanced oxidation protein products, AOPP) ed espressa in equivalenti di clorammina-T, misurati in base all'assorbanza, a 340 nm, del plasma in ambiente acido ed in presenza di ioduro di potassio.

Materiali e metodi

Abbiamo dosato i livelli plasmatici di AOPP in 51 pazienti affetti da patologie cardiovascolari, polmonari, gastrointestinali, renali e metaboliche. Contemporaneamente sono stati dosati: VES, azotemia, creatinemia, glicemia, uricemia, elettroliti, pannello lipidico, proteinemia totale e frazioni, fibrinogenemia. Per valutare la possibilità di conservare il campione plasmatico senza decrementi dei livelli di AOPP misurati, 24 dei 51 campioni sono stati processati immediatamente al momento del prelievo e dopo 7,15,30,90,180,438 giorni di congelamento, sia a -20 che a -80°C (ogni aliquota era congelata e scongelata una sola volta). Sui rimanenti 27 campioni è stato eseguito anche il dosaggio delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (thiobarbituric-acid-reactive substances, TBARS).

Risultati

La concentrazione media di AOPP nei pazienti esaminati è risultata di 48.8 ± 37.3 $\mu\text{mol/l}$. La concentrazione basale nei 24 campioni (55.0 ± 47.1 $\mu\text{mol/l}$) non ha subito modificazioni significative fino a 438 giorni di congelamento, quando aumentava sia nei campioni conservati a -80°C (96.6 ± 83.2 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0.01$) che, più marcatamente, in quelli conservati a -20°C (171.3 ± 94.6 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0.001$). I livelli di TBARS sono risultati di 1.59 ± 0.65 mmol/ml. L'analisi di regressione multipla ha evidenziato che la concentrazione di AOPP correlava ($r = 0.62$, $p < 0.001$) positivamente con azotemia e trigliceridemia, negativamente con l'età del paziente (albumina e proteine plasmatiche totali si riducono con l'età, $r = 0.3$, $p < 0.05$). La concentrazione di TBARS correlava con VES e glicemia (r multipla 0.73 , $p < 0.001$), e positivamente con AOPP ($r = 0.39$, $p < 0.05$).

Discussione e conclusioni

La concentrazione di AOPP resta stabile nei campioni congelati a -20° e -80°C fino a 6 mesi. Il riscontro di una correlazione con azotemia e trigliceridemia suggerisce che l'insufficienza renale e la dislipidemia accelerano probabilmente in vivo il processo di formazione di AOPP. Il danno ossidativo valutato dai TBARS può essere potenziato dall'esposizione all'iperglicemia e dalla conseguente glicosilazione non enzimatica delle proteine plasmatiche.

POLIMORFISMO DEL GENE IL1RN IN UNA POPOLAZIONE CARDIOLOGICA**N. Covini., M. Lotzniker**

Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera "Ospedale Civile di Legnano"

Scopo del lavoro

L'importanza della risposta infiammatoria nella progressione delle patologie cardiovascolari è attualmente oggetto di numerosi studi. Le citochine, modulando i processi infiammatori svolgono ruolo cardine anche nell'evoluzione del danno vascolare: in particolare l'azione di IL1 è fisiologicamente contrastata da suo antagonista recettoriale (IL-1Ra) che è il prodotto di un gene polimorfico (IL1RN) sito sul cromosoma 2. Tale polimorfismo può alterare l'espressione dell'antagonista recettoriale variando l'equilibrio dinamico con IL1 e di conseguenza l'intensità della risposta infiammatoria; a tale proposito lo studio presentato si prefigge di valutare l'influenza del polimorfismo di IL1RN sull'evoluzione dell'angina instabile-infarto non Q.

Materiali e Metodi

La caratterizzazione del polimorfismo è stata operata mediante amplificazione con PCR usando primers immediatamente fiancheggianti la regione polimorfica: l'analisi degli amplificati è stata effettuata tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2% e colorazione con etidio bromuro: per l'amplificazione è stato utilizzato l'enzima TaqGold.

La casistica presentata è relativa a 32 pazienti (numerosità finale prevista = 100 pazienti) con angina instabile-infarto non Q selezionati in base a specifico protocollo.

Risultati

I diversi polimorfismi del gene IL1RN sono causati dalla presenza di un numero variabile di copie (da 2 a 6) di una sequenza di 86 paia di basi all'interno del secondo introne del gene. Dei 5 possibili alleli, l'allele 1 = 4 copie e l'allele 2 = 2 copie sono descritti in letteratura a maggior frequenza mentre l'allele 3 = 5 copie, l'allele 4 = 3 copie e l'allele 5 = 6 copie sono globalmente descritti con frequenza non superiore al 5%.

Nella popolazione oggetto di studio si è riscontrata la seguente distribuzione polimorfica:

Allele 1	Omozigoti :	n = 25
Allele 2	Omozigoti:	n = 1
Alleli 1/2	Eterozigoti :	n = 4
Allele 4	Omozigote:	n = 1
Alleli 1/3	Eterozigoti:	n = 1

Discussione e conclusioni

La metodologia approntata ed in particolare l'utilizzo dell'enzima TaqGold hanno permesso una risoluzione ottimale per lo studio del polimorfismo genico di IL1RN.

La distribuzione polimorfica riscontrata si può considerare allineata ai dati presenti in letteratura per quanto riguarda la prevalenza globale dell'allele 1 e lo stato di portatore dell'allele 2 ; lo stato di omozigosi per l'allele 2 (rilevato in 1 solo caso) e la maggiore frequenza degli alleli rari 3 e 4 devono essere rivalutati sulla numerosità finale prevista. I rapporti tra assetto genico/risposta infiammatoria/evoluzione clinica saranno esaminati dopo follow-up di 6 mesi.

POLIMORFISMO DEL GENE ACE E DELL' α -ADDUCINA, MASSA E GEOMETRIA VENTRICOLARE SINISTRA IN UNA POPOLAZIONE DI IPERTESI DI PRIMA DIAGNOSI

Laratta E, Ventura G, Sciacqua A, Candigliota M, Ammendolea C, Coniglio G, F Perticone

Cattedra di Medicina Interna ed UO di Malattie Cardiovascolari, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica G. Salvatore, Università degli Studi di Catanzaro *Magna Græcia*.

Scopo del lavoro. Verificare la possibile correlazione tra polimorfismo del gene ACE e dell' α -adducina, massa ventricolare sinistra (MVS) e rimodellamento del ventricolo sinistro in una popolazione di ipertesi di prima diagnosi, residenti in Calabria da almeno due generazioni.

Materiali e metodi. Sono stati arruolati 144 pazienti, 84 maschi e 60 femmine, di età compresa tra 25 e 60 anni (media \pm DS=46.4 \pm 7.7), con ipertensione arteriosa (IA) essenziale lieve-moderata, di prima diagnosi. Ciascun paziente è stato sottoposto ad esame clinico, prelievo ematico, ecocardiogramma per la determinazione della MVS indicizzata (MVSI), e del rimodellamento ventricolare sinistro, definito sulla scorta del relative wall thickness (RWT). Il cut-off per l'ipertrofia ventricolare sinistra (IVS) era posto a 125 g/m² sia per i maschi sia per le femmine; il cut-off per il RWT era 0.45. Il DNA, estratto mediante l'utilizzo di una resina (InstaGene, Biorad), è stato successivamente amplificato mediante PCR. Per effettuare il polimorfismo del gene ACE, sono stati utilizzati 10 pmol di ciascun primer di senso ed antisense, in un volume finale di 50 μ l contenenti 3 mmol/l di MgCl₂ e PCR buffer 10x (Perkin Elmer). Il DNA è stato amplificato per 35 cicli con denaturazione a 94°C per 1 min, annealing a 58°C per 1 min ed extension a 72°C per 2 min. I frammenti di PCR di 190 bp per l'allele di delezione e di 490 bp per l'allele di inserzione sono stati separati su gel di agarosio al 1,5%. Per l' α -adducina è stata analizzata la variante genetica del residuo aminoacidico 460, in posizione nucleotidica 614. Sono stati utilizzati due primers allele specifici (FP-614G, FP-614T) e un reverse primer comune. Questi sono stati miscelati ed utilizzati in un'unica amplificazione PCR. La mix finale conteneva: 2,4 pmol/l di FP-614G, 4,8 pmol/l di FP-614T, 6 pmol/l di RP-614, 10 mmol/l di TrisHCl, 50 mmol/l di KCl, 25 μ mol/l di ogni dNTP, 0,4 U Ampli-Taq Polymerase (Perkin-Elmer) e MgCl₂ 3mmol/l e 1,5 μ l di DNA (100ng/ μ l). Il DNA è stato amplificato per 35 cicli con denaturazione a 94°C per 20 sec, annealing a 60°C per 30 sec ed extension a 72°C per 30 sec. I prodotti di PCR rispettivamente di 220 bp per l'allele 460Gly e 234 bp per l'allele 460Trp, sono stati visualizzati su gel di agarosio al 4%.

Risultati. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i pazienti appartenenti ai tre genotipi del gene ACE e dell' α -adducina per quanto riguarda età, sesso, indice di massa corporea e valori di PA clinica e monitorata. I valori di MVSI sono risultati significativamente ($p < 0.0001$, ANOVA) più elevati negli omozigoti DD (135.6 \pm 25.4 g/m²) rispetto ai pazienti ID (116.6 \pm 18.1 g/m²) ed II (99.2 \pm 25.9 g/m²). Il RWT (DD 0.43 \pm 0.06; ID 0.40 \pm 0.05; II 0.40 \pm 0.05; $p = 0.006$) è risultato significativamente differente tra i genotipi del gene ACE. L'IVS era presente in 69 pazienti (47.9%): 35 ipertrofici eccentrici (50.7%) e 34 ipertrofici concentrici (49.3%). Nei pazienti con IVS, 25 (73.5%) erano omozigoti DD, 7 pazienti (20.5%) ID e 2 (5.8%) II; tra i pazienti con IVS eccentrica, 17 (48.5%) erano DD, 15 (42.8%) erano ID e 3 (8.5%) erano II. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata documentata nei valori di MVSI e di rimodellamento ventricolare sinistro tra i tre genotipi dell' α -adducina. Si è osservato che 20 (58.5%) pazienti con IVS eccentrica erano omozigoti GG, 12 pazienti (35.2%) GT e 2 (5.8%) TT; tra i pazienti con IVS concentrica, 27 (77.1%) erano GG, 7 (20.0%) erano GT e 1 (2.8%) era TT.

Discussione e Conclusioni. I nostri dati confermano che il polimorfismo dell'ACE è in grado di influenzare sia la MVSI che la geometria ventricolare dei pazienti ipertesi, mentre nessuna apparente influenza sulla MVSI è stata possibile documentare per il polimorfismo dell' α -adducina.

INFLUENZA DELL'INSULINO-RESISTENZA E DEL POLIMORFISMO DEL GENE ACE SULLA MASSA VENTRICOLARE SINISTRA IN PAZIENTI IPERTESI MAI TRATTATI

LarattaE, Ventura G, Sciacqua A, Candigliota M, Ammendolea C, Coniglio G, F Perticone

Cattedra di Medicina Interna ed UO di Malattie Cardiovascolari, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica G.Salvatore, Università degli Studi di Catanzaro *Magna Græcia*.

Scopo del lavoro. Valutare la possibile associazione tra polimorfismo del gene ACE, insulino-resistenza (IR) e massa ventricolare sinistra (MVS) in un gruppo di pazienti ipertesi mai trattati.

Materiali e metodi. Sono stati arruolati 230 pazienti ipertesi di prima diagnosi, mai trattati (133 M e 97 F; di età media: 45 ± 5.4 anni). Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad accurato esame clinico e strumentale, determinazione della MVS indicizzata (MVSI) per la superficie corporea, insulinemia e glicemia a digiuno. L'IR è stata calcolata mediante modello dell'omeostasi metabolica ($HOMA_{IR}$). Per determinare il polimorfismo per delezione/inserzione del gene ACE, il DNA è stato estratto da sangue intero, addizionato con EDTA, mediante Insta gene matrix e successivamente amplificato mediante doppia PCR. I prodotti di amplificazione rispettivamente di 490 bp per l'allele d'inserzione e di 190 bp per l'allele di delezione sono stati visualizzati su gel di agarosio all'1,2%. Il DNA è stato estratto mediante l'utilizzo di una resina disponibile in commercio (InstaGene, Biorad) e successivamente amplificato mediante Polymerase Chain Reaction (PCR). Per effettuare il polimorfismo del gene ACE, sono stati utilizzati 10 pmol di ciascun primer di senso ed antisense, in un volume finale di 50 μ l contenenti 3 mmol/l di $MgCl_2$ e PCR buffer 10x (Perkin Elmer). Il DNA è stato amplificato per 35 cicli con denaturazione a 94°C per 1 min, annealing a 58°C per 1 min ed extension a 72°C per 2 min. Mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% sono stati separati frammenti 190 bp (allele di delezione) e frammenti di 490 bp (allele di inserzione).

Risultati. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nei tre genotipi per quanto riguarda l'età, il body mass index (BMI), i valori di glicemia e di PA clinica e monitorata. I valori di insulinemia (μ U/ml) e di $HOMA_{IR}$ sono risultati essere significativamente più elevati nel genotipo DD (16.4 ± 4.1 ; 3.7 ± 1.0) rispetto ai gruppi ID (9.6 ± 3.7 ; 2.1 ± 0.8) e II (8.0 ± 3.0 ; 1.8 ± 0.7). Analogamente, la MVSI è risultata essere significativamente più elevata ($p < 0.0001$) nei pazienti DD (143.1 ± 31.1 g/m²) rispetto ai gruppi ID (126.8 ± 25.8 g/m²) ed II (115.7 ± 22.8 g/m²). Inoltre, è stato osservato che il polimorfismo del gene ACE influenza la MVS solo nei maschi, suggerendo un effetto legato al sesso. Nel modello finale di regressione multipla, effettuata per individuare i predittori indipendenti della MVS, entrano solo l' $HOMA_{IR}$ (38.4%) e la PA (5.1%).

Conclusioni. I nostri dati dimostrano che il polimorfismo del gene ACE influenza, negli ipertesi omozigoti per delezione, il maggior grado di MVS ; tale effetto sembra essere mediato dalla IR/iperinsulinemia.

Analisi molecolare del gene (PRNP) della proteina prionica su un campione della popolazione abruzzese: distribuzione del polimorfismo Val/Met al codone 129

MB Di Sciascio, E. D'Incecco, G. Vianale, A. Santucciono, F. Balucanti¹ P. Accettura², P. Frascaria³, G. Ranalletta⁴, N. Di Sciascio, L. Cosentino⁵, P. Fazii⁵, C. D'Amario⁶, A. Bomba⁷, I. Bianco⁷, S. Martinotti

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale SS Annunziata - UDA, Chieti; ¹Laboratorio Analisi, Ospedale di Sulmona, AUSL Sulmona-Avezzano; ²Laboratorio Analisi, Ospedale di Avezzano, AUSL Sulmona-Avezzano; ³Laboratorio Analisi, Ospedale San Salvatore, AUSL L'Aquila; ⁴Laboratorio Analisi, Ospedale di Pescara, AUSL Sulmona-Avezzano; ⁵Laboratorio Analisi, Ospedale di Pescara, AUSL Pescara; ⁶Laboratorio Analisi, Ospedale di Atri, AUSL Teramo; ⁷Laboratorio Analisi, Ospedale Lanciano, AUSL Lanciano-Vasto

Scopo del lavoro

E' stato dimostrato che alcune sindromi neurodegenerative attribuibili alla cosiddetta malattia di Creutzfeldt-Jacob e alle sue varianti sono da ricollegare patogenicamente all'espressione di isoforme mutate di una proteina PRNP espressa sulla superficie neuronale. Nei tessuti infetti questa proteina può indurre apoptosi e promuovere stati degenerativi diffusi e irreversibili. Scopo del nostro lavoro è stato quello di analizzare la struttura molecolare del gene PRNP e di evidenziare polimorfismi tra la popolazione. In particolare è stata studiata la distribuzione del polimorfismo al codone 129 Val/Met, nella cui variante omozigote Met/Met si associa un tratto genetico di maggiore predisposizione alla malattia.

Materiali e Metodi

E' stato utilizzato un kit della Nuclear Laser Medicine capace di rilevare lo stato omo e/o eterozigote per il codone 129 del gene PRNP mediante oligo-ibridazione su micropiastra e rilevazione tramite anticorpo anti-DNA a doppia elica. Per l'analisi molecolare del locus genico sono stati invece utilizzati i primers: FW: 5'-TGATACCATTTGCTATGCACTCATTC-3' - RW: 5'-GACACCACCACTAAAAGGGCTGCAG-3' per l'amplificazione tramite PCR e sequenziazione automatica con primers interni all'amplicone.

Risultati

No. tested	Met/Met		Met/Val		Val/Val	
127	55/127	46.45%	61/127	48%	11/127	5.5%

Conclusioni e discussione

Il presente studio ha evidenziato la distribuzione del polimorfismo 129 nella popolazione abruzzese con una frequenza della forma omozigote Met/Met in circa il 50% dei soggetti analizzati. La variante Met/Met è considerata un tratto genetico di maggiore predisposizione alla variante cosiddetta di Creutzfeldt-Jacob. Resta tuttavia da dimostrare una esatta correlazione con l'assetto polimorfico del gene ed il ruolo di quest'ultimo nel meccanismo patogenetico reale della malattia.

RIVELAZIONE MEDIANTE AMPLIFICAZIONE GENOMICA DI CHLAMYDIA TRACHOMATIS : PRESENTAZIONE DEI DATI EPIDEMIOLOGICI RELATIVI ALLA POPOLAZIONE AFFERENTE AL NOSTRO AMBULATORIO.

Rongioletti M., Bonito L., Cortesi M., Papa F., D'Andrea B., Forastiere E., Baldassini M.

U.O. di Patologia Clinica Ospedale "San Giovanni Calibita"
Fatebenefratelli - Isola Tiberina - Roma

Scopo del lavoro:

Dopo avere introdotto una metodica di biologia molecolare in PCR per la diagnosi di Chlamydia Trachomatis, abbiamo voluto valutare i dati ottenuti su una popolazione di donne in gravidanza afferenti ai nostri ambulatori e riconsiderare i dati di uno studio epidemiologico da noi eseguito nel 1987 su una popolazione sovrapponibile per età, periodo gestazionale a quella attualmente studiata.

Materiali e metodi

Lo studio è stato effettuato su 2769 donne di età tra 20/38 \pm 2 anni (età gestazionale 32-38 settimane) afferenti al nostro ambulatorio nel 2000. I tests sono stati eseguiti con "Kit Cobas Amplicor per Chlamydia Trachomatis"- Roche. Il metodo permette di rivelare la C. Trachomatis in campioni urogenitali con tecnica di amplificazione PCR e di ibridazione dell'acido nucleico. La risposta ha valore qualitativo. Il prelievo viene effettuato con tampone apposito introdotto nel canale cervicale ad 1 cm dalla portio. La metodica comprende quattro fasi: preparazione del campione, amplificazione mediante PCR del DNA bersaglio con primers biotinilati, ibridazione dell'amplificato con oligonucleotidi specifici per il bersaglio e rivelazione del prodotto legato alla sonda mediante reazione colorimetrica. La C. Trachomatis contiene anche un plasmide criptico di circa 5700 paia di basi, comune a tutti i sierotipi; il test Cobas Amplicor CT utilizza i primers CP24 e CP27 per una sequenza di DNA di circa 207 nucleotidi all'interno del plasmide criptico. La lettura è effettuata densitometricamente ad una lunghezza d'onda di 660 nm.

Risultati

Con il metodo PCR, nell'anno 2000, su 2769 pazienti lo 0,7% risulta positivo, la sensibilità del metodo è >90%, (sovrapponibile all'isolamento in cultura) ed i falsi positivi, nella nostra casistica, non hanno rilevanza statistica. La PCR consente di ottenere i risultati in tempi più brevi, effettuare un grande numero di determinazioni con utilizzo di minori risorse umane rispetto al metodo IF usato precedentemente.

Nella casistica del 1987 su 279 utenti il 7,2% era positivo, la sensibilità era del 90%, i falsi positivi circa il 2%, ma il metodo presentava molte variabili aspecifiche.

Discussione e Conclusioni

L'introduzione del metodo in PCR ha mutato completamente la nostra statistica, l'ottima sensibilità e specificità insieme alla completa automazione del metodo ha permesso di ottimizzare anche i tempi di consegna dei referti, contribuendo ad una diagnosi e ad un'impostazione terapeutica in tempi brevi.

LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE DELLE LESIONI CERVICALI DA VIRUS HPV: ESPERIENZA DELL'A.O. DI PORDENONE

M.L.Modolo ^a, N.Monti N. ^b, S.La Valle ^c, M.Manfè ^c, A.Moratto ^a, E.Bidoli ^d, D.Villalta ^a, P.Cappelletti ^a
^aU.O.Microbiologia-Immunologia, ^bServizio di Oncologia, ^cOstetricia e Ginecologia „A.O.“S.Maria degli Angeli”, Pordenone ; ^dServizio di Epidemiologia , CRO ,Aviano

Scopo del lavoro

L'infezione persistente da Papillomavirus umano (HPV) della cervice uterina è il principale fattore di rischio per lo sviluppo delle neoplasie cervicali, con alto e basso rischio oncogeno in relazione al genotipo virale. Queste considerazioni sono state alla base della nostra esperienza e ci hanno portato a ricercare il DNA di HPV mediante amplificazione polimerasica a catena (PCR) e successiva tipizzazione del prodotto amplificato mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), per valutare la presenza dell'infezione in relazione con la diagnosi citologica (Pap test) e per stabilire il genotipo virale, allo scopo di fornire informazioni aggiuntive utili alla prevenzione delle neoplasie cervicali .

Materiali e Metodi

Pazienti : 87 donne , età media 36 anni, 74 afferenti al Centro Oncologico in seguito ad anomalie riscontrate al Papanicolau test (ASCUS, LSIL, HSIL) e 13 per controllo routinario, Pap test negative
Materiali : cellule cervico-vaginali in terreno di trasporto (soluzione fisiologica pH 8.0)
Metodi : Estrazione DNA ; PCR-HPV : primers di consenso MY09/MY11 (L1, Ting Y. e Manos M.M.) e primers tipo specifici HPV16 L1/R3 (E₆, Ferre F.), PCR-β globina primers HBF/HBFA (adeguatezza campioni); Rivelazione amplificati mediante gel elettroforesi in agarosio 2% + EtBr ; RFLP-DNA amplificato con 7 enzimi di restrizione (BamH I, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau3a I); Rivelazione pattern di digestione enzimatica con gel elettroforesi ; Tipizzazione per confronto profili di restrizione specifici con profili standard (H.U.Bernard)

Risultati

CITOLOGIA*	N° Pazienti	HPV-DNA	HPV-DNA	Odds ratio	95% CI
		Campioni positivi N°(%)	Campioni negativi N°(%)		
NEGATIVA	13	3 (23.1)	10 (76.9)	1	-
ASCUS	13	9 (69.2)	4 (30.8)	7.5	(1.3 - 43.0)
LSIL	43	27 (62.8)	16 (37.2)	5.6	(1.3 - 23.5)
HSIL	18	15 (83.3)	3 (16.7)	16.7	(2.8 - 99.7)
	87	54 (62.1)	33 (37.9)		

*NEGATIVA : alterazioni cellulari benigne di tipo reattivo ; ASCUS: cellule squamose atipiche di significato indeterminato;
 LSIL: lesione intraepiteliale squamosa di basso grado; HSIL: lesione intraepiteliale squamosa di alto grado

Discussione e conclusioni

Nel nostro studio, in accordo con i dati della letteratura , abbiamo rilevato come la presenza dell'infezione da HPV aumenti con la severità del quadro citologico. La diagnosi molecolare, inoltre, ha contribuito ad individuare 5 casi di HSIL (4 HPV 16), confermati istologicamente, in reperti citologici normali (N.1) e ASCUS (N.4); si è visto che la maggior parte delle infezioni è sostenuta da genotipi ad intermedio , ma soprattutto alto rischio : 6 differenti genotipi e 2 coinfezioni nelle LSIL , mentre nelle HSIL il genotipo prevalente è HPV16 e che 2 infezioni con genotipi a basso rischio sono associate a lesioni di basso grado. La nostra, seppur limitata esperienza, ha dimostrato come la virologia molecolare possa integrare le informazioni ottenute dallo studio morfologico, fornendo indicazioni utili nella valutazione della necessità di approfondimenti diagnostici e/o di interventi terapeutici e nella programmazione di follow up mirati , nel caso di infezioni persistenti o recidivanti in relazione al loro potenziale oncogeno.

La Polimerase Chain Reaction in fase omogenea -Real Time PCR :applicazione qualitativa e quantitativa per HCV**Barnabei R.***, Crisetti M. G.**, Petrella A.**, Varrassi S.*

*A.S.L. 04 L'Aquila Unità Operativa di Patologia Clinica

** Scuola di Specializzazione Patologia Clinica Università degli Studi L'Aquila.

Introduzione

Sin dalla sua introduzione nel 1985, la PCR è stata applicata in diversi settori di ricerca.

Negli ultimi 10 anni gli enormi progressi metodologici e strumentali della tecnologia PCR hanno favorito la sua divulgazione e l'applicazione routinaria nei laboratori di analisi clinico-diagnostiche.

L' utilizzo in routine deve sempre garantire i seguenti parametri: amplificazione del DNA specifico(target), rapidità nella preparazione del campione, ottimizzazione dei parametri di amplificazione, prevenzione da eventuale contaminazione e prevedere un metodo veloce e altamente specifico per la rivelazione dell'avvenuta amplificazione del DNA bersaglio.

Materiali e metodi

Abbiamo eseguito la determinazione qualitativa e quantitativa dell'RNA del virus dell'epatite C sul siero di 100 pazienti di cui 38 pz. R.I.B.A. + e viremia >200.000/ml ("bDNA" HCV/RNA 2.0 - Bayer), 52 pz. sicuramente negativi (donatori Anti-HCV neg. ALT normali) e 10 pazienti in trattamento con interferone e con viremie < 200.000 ("bDNA" HCV/RNA 2.0 - Bayer).

Per le nostre determinazioni è stata utilizzata una tecnica di PCR in fase omogenea: il test della 5'-nucleasi con sonde TaqMan^R - Real Time PCR sullo strumento ABI-PRISM 7700-Sequence Detector Applied Biosystem. Il principio di questa Reazione Polimerasica a Catena (PCR) è il seguente: il filamento di RNA virale "target" presente nel campione viene, dopo la fase di estrazione del campione biologico, "retrotrascritto" in cDNA (DNA complementare) grazie all'azione dell'enzima Transcriptasi Inversa (RT). Il filamento del cDNA viene denaturato e viene consentito l'annealing del "forward primer", del "reverse primer" e della sonda TaqMan^R, sonda specifica che porta due molecole fluorescenti di colore diverso: una detta "reporter" e una detta "quencer". Quando il "quencer" è spazialmente vicino al "reporter" ne inibisce l'emissione di fluorescenza. Durante la fase di amplificazione il "forward primer" che copia il filamento di cDNA grazie all'enzima "AmpliTaq Gold DNA Polymerasi" in senso 3'-5' incontra la sonda TaqMan^R legata alla sequenza bersaglio e la scalza (strand displacement) rompendola; in questo modo il "reporter" viene allontanato dal "quencer" ed è libero di emettere fluorescenza quando viene eccitato da luce (laser Argon- 488nm). Con un buon metodo di estrazione degli acidi nucleici dal campione biologico, la sensibilità di questa tecnica è elevata e si aggira intorno alle 4-5 copie/ml. L'esclusione dei falsi negativi viene ottenuta utilizzando in ogni seduta analitica un controllo interno costituito da RNA noto che viene co-estratto e co-amplificato con l'RNA target utilizzando un'altra sonda TaqMan^R specifica con "reporter" di altro colore. Il problema della contaminazione da "carry-over" di prodotti di PCR che funzionano da bersaglio in nuove reazioni di PCR è stato risolto con l'uso dell'enzima Uracil-N-glicosilasi (UNG).

Risultati

Con il nostro metodo di determinazione i 52 donatori Anti-HCV negativi sono risultati tali (HCV-RNA < 4 copie/ml). I pazienti con viremia > 200.000 copie/ml sono risultati positivi e con un ottimo coefficiente di correlazione (r = 0,98) per quanto riguarda la valutazione quantitativa. Data la elevata sensibilità della Real-time PCR fra i pazienti in trattamento con "bDNA" < 200.000 copie/ml 6 sono risultati positivi con viremie comprese fra le 500 e 150.000 copie/ml. In tutte le determinazioni si è avuta amplificazione e rivelazione dello Standard interno.

Conclusioni

La tecnica della 5'-nucleasi con sonde TaqMan, da poco introdotta nel nostro laboratorio promette una elevata sensibilità, una elevata specificità e il controllo della estrazione e della amplificazione. La tecnica in fase omogenea consente una buona praticità di esecuzione e l'assenza di errori dovuti alla fase di rivelazione.

Analisi Mutazionale del Gene BRCA1 Mediante FAMA in Famiglie con Sospetta Predisposizione genetica al Tumore della Mammella e/o dell'Ovaio: Risultati Preliminari.

E. Ricevuto^a, R. Bisegna^a, F. Casilli^a, Z.C. Di Rocco^a, G. Cianci^a, F. De Galitiis^a, G.P. De Rubeis^b, C.Ficorella^a, P. Marchetti^a and S.Martinotti^c.

^a Oncologia Medica, Dipartimento Medicina Sperimentale, Università degli Studi, L'Aquila;

^b Divisione di Chirurgia Oncologica, Ospedale S. Salavatore, L'Aquila;

^c Patologia Clinica, Università di Chieti, Chieti.

Scopo del Lavoro: L'obiettivo dello studio è l'identificazione, mediante FAMA (Fluorescence Assisted Mismatch Analysis), di famiglie che segregano mutazioni del gene BRCA1, a partire dall'analisi di pazienti affette da tumori della mammella o dell'ovaio.

Materiali e Metodi: Pazienti affette da carcinoma della mammella (Breast Cancer, BC) e/o dell'ovaio (Ovarian Cancer, OC) sono state selezionate, presso l'Oncologia Medica dell'Università dell'Aquila, in base ai seguenti criteri: familiarità per neoplasie (>2 neoplasie entro il II° di parentela), precoce insorgenza (Early-Onset, EO) (<40 anni BC; <45 anni OC) e multicentricità. Casi a rischio di predisposizione genetica > al 10% e rischio specifico di mutazione BRCA1 > al 5% sono stati successivamente selezionati previa consulenza oncologica preventiva e consenso informato scritto e avviate all'esecuzione dell'analisi genetica BRCA1 mediante FAMA.

La FAMA, tecnica di scansione molecolare semi-automatica, basata su clivaggio chimico di sequenze di DNA eteroduplex fluorescenti, è stata recentemente applicata all'analisi mutazionale del gene BRCA1 utilizzando 24 ampliconi (8 ampliconi di lunghezza superiore a 1Kb) con ottimale accuratezza diagnostica e distinzione selettiva delle differenti mutazioni.

Risultati: Un gruppo di 25 pazienti con sospetta predisposizione genetica al tumore della mammella e/o dell'ovaio sono state selezionate: 21 con sindrome di sospetta predisposizione al tumore della mammella e 4 con familiarità per il tumore della mammella e dell'ovaio.

La distribuzione dei casi è stata la seguente: 13 BCs familiari; 8 BCs senza familiarità; 4 B/OCs;

Sono state identificate 2 mutazioni BRCA1: una mutazione nonsense dell'esone 11 (Ser868Stop); una mutazione frameshift dell'esone 16 (5083del19).

La mutazione esone 11/Ser868Stop è stata osservata in un tumore dell'ovaio con familiarità specifica per carcinoma endometrioide.

La mutazione esone 16/5083del19 è stata riscontrata in una paziente con familiarità specifica per il tumore della mammella. Quest'ultima mutazione è stata osservata in diverse famiglie Italiane originarie della stessa regione (Calabria) ed è stata successivamente identificata come una mutazione endemica della popolazione Calabrese (founder).

In entrambi i casi le pazienti presentavano un tumore, rispettivamente, dell'ovaio e della mammella, a precoce insorgenza.

Discussione e Conclusioni: La frequenza delle mutazioni BRCA1 nella nostra casistica è pari a 8% (2/25). Nell'ambito delle famiglie B/OC è stata riscontrata 1 mutazione con una frequenza pari al 25% (1/4); l'altra, è stata riscontrata in casi selezionati per tumore della mammella con una frequenza pari al 4.8% (1/21). Più specificamente, quest'ultima mutazione è stata riscontrata nel gruppo dei BCs familiari, 7.7% (1/13). Le mutazioni BRCA1 negli EO-BCs risultano essere pari al 16.7% (1/6).

Il nostro studio, condotto su una piccola popolazione selezionata dell'Italia centrale conferma preliminarmente la rilevanza della effettuazione dell'analisi genetica BRCA1 in famiglie con sindrome a sospetta predisposizione al tumore della mammella e dell'ovaio in probande con familiarità per tumori della mammella e ovaio e in probande con familiarità specifica per tumori della mammella a precoce insorgenza.

DIAGNOSI PRENATALE DI UNA MUTAZIONE DEL GENE DELLA RODOPSINA TRAMITE CLIVAGGIO CHIMICO DEL MISMATCH.

A. Tessitore*, E. Toniato*, A. Gulino[§], L. Frati[§], E. Ricevuto*, M. Vadalà[#], E. Vingolo[#] e S. Martinotti[†].

*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di L'Aquila; [§]Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università "La Sapienza", Roma; [^]Istituto Neuromed, Pozzilli, Isernia; [#]Istituto di Oftalmologia, Università "La Sapienza", Roma; [†]Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Università "G. D'Annunzio", Chieti.

Scopo del lavoro

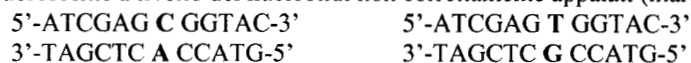
In questo lavoro è riportata la prima diagnosi prenatale di mutazioni del gene della rodopsina (Rho), coinvolto nella patogenesi della retinite pigmentosa. L'analisi molecolare è stata effettuata tramite sequenziamento automatico, metodo convenzionalmente usato, e Fluorescence-Assisted Mismatch Analysis (FAMA), tecnica basata sul clivaggio chimico del mismatch in molecole di DNA heteroduplex fluorescente, derivanti dall'appaiamento di un allele mutato con un allele normale. FAMA è una procedura molto sensibile e specifica, già descritta per l'identificazione di mutazioni "germline", ma mai applicata precedentemente alla diagnosi prenatale di lesioni geniche.

Materiali e metodi

Per l'analisi molecolare è stato utilizzato DNA genomico estratto da villi coriali e da linfociti di sangue periferico prelevati da una paziente in gravidanza, colpita da una grave forma autosomica dominante di retinite pigmentosa, dovuta alla mutazione del gene Rho CGG/TGG (Arg135Trp). I 5 esoni del gene sono stati analizzati tramite sequenziamento diretto automatico e Fluorescence-Assisted Mismatch Analysis (FAMA), utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 377. Per l'esame di sequenza sono state sintetizzate quattro coppie di "primer", al fine di ottenere mediante PCR altrettanti frammenti contenenti in totale i cinque esoni del gene. Ogni frammento amplificato è stato analizzato tramite sequenziamento dei filamenti senso ed antisenso. Per l'analisi mediante FAMA, il DNA è stato amplificato utilizzando "primer" marcati con fluorofori filamento-specifici (6-FAM, filamento senso, ed HEX, antisenso). I frammenti bi-fluorescenti, ottenuti dalla PCR, sono stati sottoposti a denaturazione ed incubati per consentire la formazione del DNA heteroduplex. I prodotti ottenuti sono stati quindi trattati con idrossilammina o tetrossido di osmio, agenti capaci di modificare chimicamente le citosine e le timine non adeguatamente appaiate. Il DNA heteroduplex è stato poi incubato con piperidina per permettere il clivaggio chimico dei nucleotidi modificati. I prodotti di reazione sono stati sottoposti ad elettroforesi in condizioni denaturanti ed i dati ottenuti sono stati analizzati con il software GeneScan 3.1 (Applied Biosystems).

Risultati

Mediante analisi di sequenza è stata evidenziata, nel DNA estratto da villi coriali e da PBLs, la sostituzione nucleotidica CGG/TGG nel secondo esone del gene Rho, che genera l'alterazione patologica Arg135Trp. Lo stesso risultato si otteneva analizzando i campioni tramite FAMA, che determinava la formazione di due frammenti a singolo filamento marcati con il fluoroforo 6-FAM (senso), dovuti al clivaggio chimico del DNA heteroduplex bi-fluorescente a livello dei nucleotidi non correttamente appaiati (marcati in grassetto):



Discussione e Conclusioni

Lo studio ha descritto la prima diagnosi prenatale di una mutazione del gene Rho (CGG/TGG Arg135Trp), coinvolta nell'insorgenza di una forma di retinite pigmentosa autosomica dominante. L'analisi è stata effettuata tramite sequenziamento automatico diretto, metodo convenzionalmente utilizzato, e Fluorescence-Assisted Mismatch Analysis (FAMA), una procedura molto sensibile e specifica basata sul clivaggio chimico del mismatch. La sostituzione nucleotidica C>T è stata identificata nel DNA estratto da villi coriali sia con la sequenza diretta sia con FAMA. Pertanto la FAMA può essere proposta come metodo di indagine per la diagnosi prenatale di mutazioni del gene della rodopsina e, in associazione con la sequenza automatica, può fornire un valido strumento per una più accurata identificazione delle alterazioni genetiche.

RICERCA DELLA MUTAZIONE DEL FV LEIDEN E DELLA MUTAZIONE G20210A DEL FATTORE II. DATI DI LABORATORIO E CORRELAZIONI CLINICHE.

R. Tripaldi * , N.Nuzzo **, G. Di Nunzio, D. Pilolli ****

* Laboratorio-Analisi,Biologia Molecolare, Az. Ospedaliera SS. Annunziata Taranto.

**Centro Coagulazione ed Emofilia, Az. Ospedaliera SS. Annunziata Taranto.

Scopo del lavoro

Sono stati identificati come sicuri fattori di rischio tromboembolico venoso due disordini ereditari identificabili con indagine molecolare diretta: la mutazione del Fattore V Leiden e la mutazione G20210A del Fattore II. Scopo del lavoro è presentare la nostra casistica relativa alla ricerca delle due mutazioni, con particolare attenzione alle correlazioni cliniche delle stesse.

Materiali e Metodi

La ricerca è stata effettuata in pazienti con storia di trombosi venosa e/o arteriosa insorta in età inferiore ai 50 anni, in pazienti con anamnesi familiare positiva per malattia trombotica e in familiari di pazienti risultati positivi alla ricerca.

L'analisi genetica è stata effettuata mediante amplificazione multiplex e ibridazione su strip di nitrocellulosa, evidenziando la presenza sia delle sequenze mutate sia di quelle non mutate.

Risultati

Dal Luglio 1999 al Giugno 2001 sono stati identificati n.92 portatori di FVL, di cui 90 eterozigoti e 2 omozigoti e n.18 portatori di FIIM allo stato eterozigotico; in tre pazienti si osservava la doppia eterozigosi e in una paziente la presenza di FVL era associata a deficit di proteina C.

Nei pazienti sintomatici (49 per il FVL e 7 per il FIIM) l'età media di insorgenza del primo evento trombotico era rispettivamente di 45aa (range 20-76) e di 47aa (range 30-67).

Nei due pazienti portatori della mutazione allo stato di omozigosi l'età di insorgenza dell'evento trombotico era precoce (18 e 25 anni), così come nei tre pazienti con doppio difetto (31,30 e 20 anni).

Gli eventi clinici osservati erano rappresentati per i portatori di FVL da eventi trombotici venosi in 45 pazienti(91%), per i portatori di FIIM da 6 TVP e 1 trombosi dell'arteria centrale della retina.

In 19 pazienti(34%) l'evento trombotico è associato ad un fattore di rischio acquisito (assunzione di estrogeni, chirurgia, gravidanza) e in due ad una ipoplasia congenita della vena cava.

Discussione e Conclusioni

I nostri dati confermano la necessità della ricerca delle mutazioni del fattore V e del fattore II associata ai più comuni dosaggi della antitrombina, della proteina C, della proteina S e della ricerca della Resistenza alla proteina C come screening delle condizioni trombofiliche ereditarie nei soggetti con storia di trombosi insorta in età giovanile. Nei pazienti anziani la scelta dell'esecuzione dei test sarà guidata da una valutazione anamnestica del paziente (storia clinica e familiare). Le informazioni raccolte potranno essere di aiuto per una adeguata scelta terapeutica sia per la cura dell'evento trombotico osservato che per una attenta profilassi degli eventi tromboembolici in corso di condizioni di rischio.

POLIMORFISMO DEL GENE ACE E DELL' α -ADDUCINA, "SODIO-SENSIBILITÀ" E MASSA VENTRICOLARE SINISTRA IN UNA POPOLAZIONE DI IPERTESI DI PRIMA DIAGNOSI

Laratta E, Sciacqua A, Ventura G, Coniglio G, Ammendolea C, Cuda G, F Perticone

Cattedra di Medicina Interna ed UO di Malattie Cardiovascolari, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica G.Salvatore, Università degli Studi di Catanzaro *Magna Græcia*.

Scopo del lavoro. Verificare in una popolazione di ipertesi di prima diagnosi, mai trattati, la possibile correlazione tra: 1) polimorfismi del gene ACE e dell' α -adducina e sodio-sensibilità (SS); 2) polimorfismi del gene ACE e dell' α -adducina e massa ventricolare sinistra (MVS).

Materiali e metodi. In 40 pazienti, 25 maschi e 15 femmine, di età compresa tra 31 e 56 anni (media \pm DS = 44.1 \pm 7.0), la "SS" è stata valutata mediante il test di Weinberger e la massa ventricolare mediante ecocardiogramma. Di questi, 19 pazienti (48.2%) sono risultati sodio sensibili (SS) e 21 (51.8%) sodio resistenti (SR). Il DNA è stato estratto mediante l'utilizzo di una resina (InstaGene, Biorad) e successivamente amplificato mediante PCR. Per effettuare il polimorfismo del gene ACE, sono stati utilizzati 10 pmol di ciascun primer di senso ed antisense, in un volume finale di 50 μ l contenenti 3 mmol/l di MgCl₂ e PCR buffer 10x (Perkin Elmer). Il DNA è stato amplificato per 35 cicli con denaturazione a 94°C per 1 min, annealing a 58°C per 1 min ed extension a 72°C per 2 min. Mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% sono stati separati frammenti 190 bp (allele di delezione) e di 490 bp (allele di inserzione). Per l' α -adducina abbiamo analizzato la variante genetica del residuo aminoacidico 460, localizzata in posizione nucleotidica 614 nell'esone 10. Sono stati utilizzati due primers allele specifici (FP-614G, FP-614T) e un reverse primer comune che sono stati miscelati ed utilizzati in un'unica amplificazione PCR. La mix finale conteneva: 2,4 pmol/l di FP-614G, 4,8 pmol/l di FP-614T, 6 pmol/l di RP-614, 10 mmol/l di TrisHCl, 50 mmol/l di KCl, 25 μ mol/l di ogni dNTP, 0,4 U Ampli-Taq Polymerase (Perkin-Elmer) e MgCl₂ 3mmol/l. Sono stati utilizzati 1,5 μ l di DNA (100ng/ μ l). La PCR è stata effettuata su PE-9700, il DNA è stato amplificato per 35 cicli con denaturazione a 94°C per 20 sec, annealing a 60°C per 30 sec ed extension a 72°C per 30 sec. I prodotti di PCR rispettivamente di 220 bp per l'allele 460Gly e 234 bp per l'allele 460Trp, sono stati visualizzati su gel di agarosio al 4%

Risultati. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra i due gruppi per quanto riguarda età, indice di massa corporea, PA clinica e monitorata. Nei pazienti SS la MVS indicizzata (MVSI) è risultata significativamente ($p < 0.0001$) più elevata (124.8 \pm 18.1g/m²) rispetto ai pazienti SR (107.6 \pm 20.2 g/m²); il diametro telediastolico del ventricolo sinistro, pur aumentato nei SS (50.2 \pm 2.7 mm) rispetto ai SR (48.4 \pm 4.7 mm), non è risultato significativamente differente. L'analisi, per genotipo dell'ACE e dell' α -adducina, ha consentito di osservare che dei pazienti SS, 12 (63.15%) erano DD e 7 (36.8%) erano ID; 10 pazienti (53%) erano GG e 9 (47%) erano GT. In accordo con il genotipo del gene ACE, è stata documentata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.01$), per quanto riguarda la MVSI, negli omozigoti DD (132.3 \pm 14.8 g/m²) rispetto agli eterozigoti ID (112.8 \pm 17.6 g/m²), la PAS notturna (136.4 \pm 6.9 mmHg vs 127.4 \pm 6.7 mmHg) ($p < 0.01$) e la PAD notturna (83.6 \pm 6.9 mmHg vs 78.0 \pm 7.0 mmHg) ($p < 0.01$), rispettivamente. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata documentata nei genotipi dell' α -adducina per quanto riguarda la MVSI (GG, 131.6 \pm 17.4 g/m² vs GT, 116.9 \pm 16.9 g/m²) e valori di PA clinica e monitorata. Dei pazienti SR, 7 (33.3%) erano DD, 14 (66.6%) erano ID+II; 11 (52.3%) pazienti erano GG e 10 GT+TT (47.6%).

Conclusioni. Nei pazienti SS, il solo polimorfismo dell'ACE sembra influenzare significativamente i livelli pressori e la MVSI. Tale dato, stante anche il numero non elevato dei pazienti studiati merita, tuttavia, ulteriore approfondimento.

SENSIBILE ANALISI DI MUTAZIONI SOMATICHE DEL GENE P53 TRAMITE FLUORESCENCE-ASSISTED MISMATCH ANALYSIS (FAMA) IN CAMPIONI DI TUMORE DELLA MAMMELLA.

A. Tessitore¹, C.Z. Di Rocco¹, K. Cannita¹, E. Ricevuto¹, E. Toniato¹, M. Tosi², C. Ficorella¹, L. Frati^{3,4}, A. Gulino³, P. Marchetti¹ e S. Martinotti⁵.

¹ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di L'Aquila; ² Unité d'Immunogénétique, Institut Pasteur, Paris; ³ Istituto Neuromed, Pozzilli, Isernia; ⁴ Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università "La Sapienza", Roma; ⁵ Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Università "G.D'Annunzio", Chieti.

Scopo del lavoro

In questo studio la Fluorescence-Assisted Mismatch Analysis (FAMA), una sensibile tecnica di scansione molecolare semi-automatizzata basata sul clivaggio chimico del mismatch in molecole di DNA heteroduplex bi-fluorescente e nata come metodo molecolare per l'esame di alterazioni geniche "germline", è stata applicata per la prima volta alla individuazione di mutazioni somatiche del gene p53. Campioni di DNA estratto da tumore della mammella sono stati esaminati in parallelo tramite PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) di prodotti radiomarcati, sequenza automatica diretta e FAMA, allo scopo di valutare il livello di sensibilità e specificità di ogni procedura.

Materiali e metodi

Gli esoni 5-9 del gene p53 sono stati analizzati tramite SSCP, sequenza automatica e FAMA in 41 campioni di DNA estratti da tumori della mammella. Per ogni campione, l'esame tramite SSCP e sequenziamento automatico è stato effettuato su 5 frammenti di DNA amplificato (1 per ogni esone), mentre la FAMA è stata condotta su due lunghi frammenti (1,3 Kb e 900 bp, rispettivamente, contenenti gli esoni 5,6,7 ed 8,9 del gene) marcati all'estremità 5' con fluorofori filamento-specifici (6-FAM per il filamento senso ed HEX per l'antisense). Il DNA bi-fluorescente ottenuto tramite PCR è stato denaturato ed incubato per permettere la formazione del DNA heteroduplex, derivante dall'appaiamento di un allele mutato con un allele normale. I frammenti sono stati trattati con idrossilammina o tetrossido di osmio, agenti che modificano chimicamente le citosine e le timine non adeguatamente appaiate, e quindi incubati con piperidina, che taglia il DNA a livello delle basi modificate. I prodotti della reazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel denaturante di acrilammide, utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 377. I dati ottenuti sono stati analizzati con il software GeneScan 3.1 (Applied Biosystems).

Risultati

Il clivaggio chimico del mismatch in molecole di DNA heteroduplex genera frammenti di DNA fluorescente a singolo filamento specificamente marcati all'estremità 5' che, sottoposti ad elettroforesi in condizioni denaturanti, danno precise informazioni sulla posizione e sul tipo di mutazione.

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella che segue:

	PCR-SSCP	Sequenza automatica	FAMA
Campioni positivi	19/41 (46.3%)	13/41 (31.7%)	14*/41 (34%)
Campioni falsi-positivi	7/41 (17%)	0	0
Campioni falsi-negativi	2/41 (4.8%)	1/41 (2.4%)	0
Campioni mutati	9/41 (22%)	10/41 (24.3%)	11*/41 (26.8%)
Campioni con polimorfismi	3/41 (7.3%)	3/41 (7.3%)	3/41 (7.3%)

* uno dei campioni, analizzato sia mediante SSCP sia mediante sequenziamento, risulta negativo

Discussione e Conclusioni

Dal confronto tra SSCP, sequenza automatica e FAMA, condotte su 41 campioni di DNA estratto da tumore della mammella, emergono le seguenti considerazioni: 1) la FAMA mette in luce risultati falsi-positivi, dovuti all'analisi SSCP; 2) la FAMA evidenzia risultati falsi-negativi, ottenuti non solo tramite SSCP, ma anche tramite sequenza automatica; 3) la FAMA è una procedura accurata che consente di individuare le mutazioni somatiche del gene p53 in tumori della mammella con alta specificità e sensibilità.

RUOLO CHIAVE DEL POLIMORFISMO GENETICO 4G/5G NELLE VARIAZIONI PLASMATICHE DEL PAI-1 INDOTTE DA SUPPLEMENTAZIONE CON VITAMINA E IN SOGGETTI DIABETICI DI TIPO 2.

R. Testa¹, I. Testa², A.R. Bonfigli¹, S. Manfrini², C. Sirolla¹, D. Mari³, E. Sacchi⁴, C. Franceschi¹

¹INRCA, Dip.Ricerche Gerontologiche, Ancona. ²Università di Ancona, Istituto di Clinica Medica, Ancona, ³IRCCS Ospedale Maggiore, Università di Milano, Dip. di Medicina Interna, Milano, ⁴Ospedale L.Sacco, Dip. di Immunoematologia e TrASFusionale, Milano.

Scopo del lavoro

Il polimorfismo genetico dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1(PAI-1) 4G/5G è stato dimostrato essere un fattore importante nella genesi del danno micro e macroangiopatico. In particolare è stato chiamato in causa l'allele 4G del polimorfismo del gene promoter che, aumentando l'espressione del PAI-1, sembra così determinare una condizione di ipofibrinolisi. Poiché il diabete mellito di tipo 2 è una patologia associata ad aumento del PAI-1 plasmatico e la supplementazione con vitamina E è capace di abbassarne i livelli, abbiamo voluto vedere se l'effetto di tale vitamina poteva essere condizionato dal polimorfismo genetico 4G/5G.

Materiali e Metodi

Sono stati studiati 28 pazienti con diabete mellito di tipo 2 (19 uomini; 9 donne; età media \pm DS:61.3 \pm 5.8 anni) selezionati secondo i seguenti criteri: stretto range di età, terapia dietetica, buon compenso glicometabolico nei due mesi precedenti lo studio. Sono state somministrate 500 UI/die di vitamina E per 10 settimane e sono stati valutati i principali parametri glico-lipometabolici ed emocoagulativi all'inizio dello studio e alla 5°-10° e 30° settimana.

Risultati

Tra le varie fasi dello studio sono state evidenziate significative differenze per PAI-1 antigene (PAI-1 Ag) ($p < 0.01$), e PAI-1 attività (PAI-1 At) ($p < 0.01$). In particolare si è potuto notare un significativo decremento del PAI-1 Ag e PAI-1 At tra il tempo 0 e la 10° settimana (35,3 \pm 8.2 ng/ml vs. 25,1 \pm 5,9 per PAI-1 Ag e 17,9 \pm 5,9 U/ml vs. 11,7 \pm 7,0 per PAI-1 At, $p < 0.01$) seguito da un ripristino dei valori basali al wash-out. I pazienti con genotipo 4G/4G mostravano gli stessi andamenti dei soggetti con genotipo 4G/5G, mentre i diabetici 5G/5G mostravano trend significativamente diversi ($p < 0.01$).

Discussione e Conclusioni

I nostri dati evidenziano che la presenza di almeno un allele 4G condiziona, nei pazienti diabetici trattati con vitamina E, decrementi nel tempo del PAI-1 completamente diversi rispetto ai soggetti che sono omozigoti per l'allele 5G. Questa dimostrazione di una differente risposta gene-dipendente a stimoli capaci di far variare i livelli del PAI-1 apre nuove ipotesi sul ruolo patogenetico del polimorfismo 4G/5G, che quindi non condizionerebbe solamente i livelli basali del PAI-1, ma sarebbe anche capace di influenzarne le variazioni.

APPLICAZIONI DI UNA NUOVA METODOLOGIA BIO-MOLECOLARE (FAMA) NELLO SCREENING MUTAZIONALE DEL GENE DELLA FIBROSI CISTICA

R. Tennina*, **P. Moretti§**, **L. Biordi***, **E. Toniato***, **C. Di Battista§**, **S. Martinotti#**.

*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di L'Aquila

#Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Ospedale SS Annunziata, Università di Chieti-UDA

§ Centro Fibrosi Cistica-Regione Abruzzo, Ospedale Civile - Teramo

Scopo del lavoro

La Fibrosi Cistica è una malattia genetica autosomica recessiva, che provoca nei pazienti tipiche alterazioni delle secrezioni mucose e sierose dovute ad una disfunzione del gradiente ionico fisiologico, in particolare a carico dello ione cloro. Il gene responsabile di questa patologia (CFTR) isolato nel 1989 da Lap-Chee Tsui e John R. Riordan mappa sul braccio lungo del cromosoma 7. Sono state, ad ora, descritte quasi 1000 mutazioni, ma soltanto alcune possono essere raggruppate in cluster di maggiore frequenza. Scopo del nostro lavoro è stato quello di utilizzare una nuova metodica d'indagine molecolare che potesse consentire:

- una maggiore e più adeguata accuratezza diagnostica nell'analisi eterozigote;
- la possibilità di evidenziare mutazioni *de-novo* lungo il locus del gene.

Materiali e metodi

La metodica che risponde a queste caratteristiche utilizza la tecnologia denominata F.A.M.A. (Fluorescence Assisted-mismatch Analysis), che consente una analisi di frammentazione del DNA su templatato bifluorescente amplificato mediante PCR non radioattiva degli esoni del gene CFTR. I prodotti amplificati sono stati sottoposti a denaturazione ed *annealing* per la formazione degli eteroduplex e successivamente marcati su basi specifiche con gruppi organici. Gli eteroduplex chimicamente modificati sono stati tagliati con piperidina e sottoposti all'analisi di frammentazione del DNA.

Risultati

CFTR mutations by PCR-OLA		CFTR mutations by F.A.M.A	
DF508	42.3%	DF508	42.3%
11/26		11/26	
G542X	19.23%	G542X	19.23%
5/26		5/26	
2183G	7.69%	2183G	7.69%
2/26		2/26	
2789+5A	11.53%	2789+5A	11.53%
3/26		3/26	
R334W	3.84%	R334W	3.84%
1/26		1/26	
R553X	3.84%	R553X	3.84%
1/26		1/26	
Unknown	11.53%	E585X	3.84%
3/26		1/26	
		*Unknown	7.69%
		2/26	

Conclusioni

I dati indicano che a dispetto delle metodiche convenzionali (PCR-OLA) la FAMA si candida come uno dei "tool" migliori per l'analisi molecolare dei geni complessi.

LIVELLI DELL' α 2-MACROGLOBULINA PLASMATICA NELLA MALATTIA D'ALZHEIMER; CORRELAZIONE CON I GENOTIPI DELL'APOLIPOPROTEINA E

Ruggeri M.(1), Scacchi R.(2), Bambina G.(3), Martini M.C.(3), Corbo R.M.(2).

- 1) U.O.D. di Medicina di Laboratorio 1 -Azienda Ospedaliera S.Giovanni – Addolorata-Roma
- 2) Centro di Genetica Evoluzionistica del CNR e Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università "La Sapienza" Roma
- 3) Divisione di Neurologia, Azienda Ospedaliera di Verona

La α 2-macroglobulina plasmatica (α 2-M) è un inibitore delle proteasi presente nelle placche amiloidi dei pazienti con malattia di Alzheimer (AD). Essa si lega alla beta amiloide solubile di cui media la degradazione, però è stato osservato anche che un eccesso di α 2M può avere effetti neurotossici.

Un polimorfismo individuato nel gene dell' α 2M, consistente nell'inserzione/delezione di 5 nucleotidi al 5' dell'esone 18, sembra associato alla suscettibilità alla AD sporadica tardiva.

Scopo di questo lavoro è analizzare in pazienti con AD sporadico e relativi controlli il polimorfismo dell' α 2M e dosarne i livelli plasmatici per verificare la sua possibile utilizzazione quale biomarcatore nella diagnosi di AD.

Materiali e metodi. Il polimorfismo del DNA è stato determinato dopo amplificazione con PCR secondo il metodo di Kovacs et al. (1999). L' α 2M plasmatica è stata dosata con un metodo nefelometrico (antisieri DADE Behring) ed espressa in mg/dL.

Il campione è costituito da pazienti con diagnosi di probabile AD ultraottuagenari (85 soggetti, età media = 86.1 ± 3.8 anni) e relativi controlli (156 soggetti, età media = 83.8 ± 3.2 anni) originari della provincia di Verona.

Risultati. Le frequenze dell'allele α 2M-2 (con la delezione), che in alcuni studi è risultato associato ad un aumentato rischio di AD, sono simili nei pazienti (0.167) e nei controlli (0.146).

Anche i livelli plasmatici di α 2M sono simili nei pazienti (274.8 ± 77.8 mg/dL) e nei controlli (269.5 ± 81.2 mg/dL), ma nei pazienti mostrano una tendenza ad aumentare con l'età.

Non esiste alcuna differenza nei livelli plasmatici di α 2M associati ai tre diversi genotipi determinati dal polimorfismo inserzione/delezione.

I livelli plasmatici di α 2M differiscono invece secondo il genotipo dell'apolipoproteina E (APOE), gene notoriamente coinvolto nella suscettibilità all'AD. I pazienti AD omozigoti per l'allele APOE *3 hanno livelli di α 2M significativamente più alti (286.8 mg/dL) rispetto ai portatori di APoE *4 (259.7 mg/dL) e di APOE*2 (224.3 mg/dL) ($p = 0.02$).

Conclusioni 1) Come già altri studi sembrano indicare, il polimorfismo per la delezione pentanucleotidica dell' α 2M non sembra associato all'insorgenza di AD sporadico tardivo.

2) Essendo i livelli plasmatici di α 2M simili nei pazienti AD e nei controlli, il dosaggio di questo biomarcatore non risulta utile nella diagnosi di AD.

3) In un lavoro precedente avevamo trovato nei soggetti AD omozigoti per l'allele APOE*3 un eccesso significativo di α 1-antichimotripsina (ACT), una proteina come l' α 2M presente negli stati infiammatori. L'osservazione di più elevati livelli anche di α 2M suggerisce che negli omozigoti per l'allele APOE*3 l'infiammazione possa avere un ruolo rilevante nella patogenesi dell'AD rispetto ai portatori dell' APOE*4, l'allele considerato fattore di rischio per la suscettibilità all'AD.

Iperomocisteinemia e fattori di variabilità in un campione della popolazione

Innocenti B., Lucchetti A., *Palla P., **De Marco S., **Carrai M., °Paci A.,
^Matteucci E., ^Giampietro O., Rossi L.

^Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa

Laboratorio Analisi Chimiche e Microbiologiche 1, *Centro Trasfusionale, **U.O. Medicina
D'urgenza, °U.O. Medicina Cardiovascolare, Azienda Ospedaliera Pisana

Scopo del lavoro

Negli ultimi anni ha destato molto interesse il possibile ruolo dell'aumento dell'omocisteina nella patogenesi della malattia cardiovascolare e tromboembolica. I dati della letteratura indicano come la presenza di valori elevati rappresenti un fattore di rischio indipendente per malattie cardiovascolari di tipo vaso-ostruttivo (aterosclerosi, trombosi). Il range di normalità dei valori di omocisteinemia è influenzato da variabili demografiche (sesso, età, fumo, etc...): pazienti in età avanzata e di sesso maschile tendono a presentare valori più elevati. La soglia proposta per la definizione di iperomocisteinemia è di 15 umol/L, anche se, ovviamente, i risultati ottenuti in studi di popolazione devono tener conto delle cause di variabilità sopra descritte. Occorre inoltre tener presenti i diversi fattori che possono influire sul metabolismo dei folati (ad esempio l'alimentazione). Lo scopo della valutazione è di verificare la presenza di livelli elevati (> 15 umol/L) di omocisteina in pazienti con patologia cardiovascolare in atto o con alterazioni del metabolismo glicidico e di confrontare i risultati ottenuti in queste categorie di soggetti con due gruppi di controllo: a) un campione di donatori volontari di sangue; b) un campione della popolazione afferente ai servizi ambulatoriali e di analisi.

Materiali e metodi- Il test per Omocisteina (tHcy) su analizzatore Abbott Imx per la determinazione quantitativa in campioni di siero o plasma umano si avvale della tecnologia FPIA (fluorescenza a luce polarizzata). Il dosaggio ha una sensibilità analitica < 0,5 umol/L ed un "range" di linearità da 2,5 a 50 umol/L. Lo studio ha coinvolto: 26 pazienti consecutivi non selezionati con diagnosi accertata di patologia cardiovascolare, 86 pazienti consecutivi non selezionati con diagnosi accertata di diabete mellito di tipo I, 86 donatori volontari di sangue, 57 pazienti ambulatoriali. Per ogni soggetto erano disponibili le seguenti caratteristiche demografiche: età, sesso e abitudine al fumo.

Risultati

Gruppo	Cardiovascolari	Diabete	Donatori	Ambulatoriali
N. soggetti	26	86	86	57
Età media	64,6	41,9	36,6	45,3
Fumatori %	69,2	44,2	23,3	49,1
Rapporto M/F	2,25	0,75	2,44	1,04
Hcy fumatori (media e d.s.)	14,62±10,85	13,96±15,26	17,31±13,14	13,94±5,14
Hcy non fum.(media e d.s.)	14,18±4,28	10,96±8,91	13,17±8,27	11,46±4,58
Hcy maschi (media e d.s.)	15,15±10,34	14,77±15,41	15,23±10,3	14,31±4,95
Hcy femmine (media e d.s.)	12,98±4,89	10,41±8,65	11,43±7,57	11,15±4,54
Hcy totale (media e d.s.)	14,4±8,97	12,29±12,14	14,13±9,7	12,72±4,39
Hcy > 15 umol/L (n. e %)	6 (23,1)	11 (12,8)	17 (19,8)	12 (21,1)
Hcy > 30 umol/L (n. e %)	1 (3,8)	2 (2,3)	9 (10,5)	2 (3,5)

Discussione e conclusioni- I valori medi di Hcy sono risultati costantemente superiori nei maschi rispetto alle femmine in tutti i gruppi esaminati, confermando precedenti osservazioni. Per contro, non si sono rilevate differenze nei gruppi di pazienti rispetto ai gruppi di controllo. L'effetto del fumo sui livelli di Hcy era rilevabile solo nei due gruppi numericamente più consistenti (pazienti con diabete e donatori di sangue). Sorprendentemente, proprio in quest'ultima categoria di soggetti "sani" era maggiormente frequente il riscontro di livelli chiaramente elevati di Hcy. Dai nostri dati appare opportuno un controllo periodico dei livelli di Hcy nella popolazione "sana" o senza patologia apparente, dato il frequente riscontro di valori superiori alla norma.

IPEROMOCISTEINEMIA NEI PAZIENTI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO CRONICO.

M.L. Papa ^a, F. Capasso ^a, L. Pudore ^a, S. Torre ^a, F. Demurtas ^a, V. Russo ^a, E. De Felice ^b, G. Vecchione ^c, A. Bossone ^c, A. Rocino ^a, F. De Francesco ^d, D. De Lucia ^d and M. Margaglione ^c.

^aLaboratorio di Emostasi e Trombosi, Ospedale San Giovanni Bosco; Napoli; ^bServizio di Nefrologia ed Emodialisi, Clinica “ Nostra Signora di Lourdes “;Napoli. ^cUnità di Aterosclerosi e Trombosi, IRCCS “Casa Sollievo della Sofferenza “; San Giovanni Rotondo. ^dLaboratorio di Emostasi e Trombosi, Istituto di Patologia Generale ed Oncologia, II Università di Napoli.

Scopo del lavoro

Studi epidemiologici hanno evidenziato che l'iperomocisteinemia è un rischio indipendente di aterosclerosi nella circolazione coronarica, cerebrale e periferica. Elevati livelli di omocisteina si riscontrano nella insufficienza renale. Sebbene i livelli di omocisteina sono correlati positivamente con la creatinina, la causa dell'incremento di omocisteina nella insufficienza renale cronica ancora non è stata del tutto chiarita. Nel nostro studio abbiamo misurato i livelli plasmatici di omocisteina per valutare l'impatto come nuovo fattore di rischio prematuro di aterosclerosi nei pazienti in trattamento emodialitico cronico (EC).

Materiali e metodi

Abbiamo studiato 74 pazienti uremici in EC (44 M e 30 F, di età media 61±14.3 anni). Cento soggetti sani dello stesso background di origine, di pari sesso ed età rappresentavano il gruppo di controllo. I livelli di omocisteina totale furono dosati mediante metodica HPLC con elettroforesi capillare.

Risultati

I livelli di tHcy nei pazienti maschi in EC erano significativamente più elevati rispetto a quelli dei controlli (54.8±40 µM/L vs. 12.6±4.3 µM/L) e nelle pazienti donne comparate rispetto ai controlli (38±37 µM/L vs. 7.8±3.2 µM/L). Livelli elevati di tHcy (> 95th percentile) pari a 19.3 µM/L nei soggetti maschi e 13.5 µM/L nelle donne furono riscontrati in 38 dei 44 maschi ($\chi^2=22.2$; $p<.001$) ed in 28 delle 30 femmine ($\chi^2=14.0$; $p<.001$).

L'iperomocisteinemia riscontrata nel gruppo pazienti non si associa ad un'elevata frequenza per il polimorfismo +/- della MTHFR (16% vs. 14%; $p=ns$).

Discussioni e conclusioni

L'iperomocisteinemia nell'insufficienza renale cronica aumenta il rischio di aterosclerosi nei soggetti in EC. Tutto questo verosimilmente dovrebbe essere correlato al danno vascolare in corso di EC che produce uno stato di ipercoagulabilità con conseguente rischio trombotico.

L'iperomocisteinemia come nuovo marker di rischio cardiovascolare nel paziente uremico in emodialisi: conclusioni di una valutazione

Rossi L., Lucchetti A., Mugnaini P., °Caprioli R., °Lippi A., °Rindi P., Innocenti B.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1,
°Nefrologia con Trapianti, Azienda Ospedaliera Pisana

Scopo del lavoro

Il paziente uremico in trattamento emodialitico cronico ha un rischio di mortalità per fattori cardiovascolari dieci volte superiore rispetto alla popolazione di pari età. Nei pazienti con insufficienza renale terminale i valori di omocisteina sono più elevati rispetto alla popolazione generale in rapporto alle variazioni metaboliche e all'alterata escrezione dell'aminoacido. Tra i fattori che determinano i livelli plasmatici di omocisteina vi sono la vitamina B6, B12 ed i folati; la correlazione negativa con i folati è rispettata anche nei soggetti in emodialisi. Scopo dello studio è stato di valutare gli effetti della somministrazione di metiltetraidrofolato sui livelli plasmatici di omocisteina nei pazienti in emodialisi cronica, attraverso la determinazione del test a scadenze prestabilite (basale, due mesi, cinque mesi).

Materiali e metodi

40 pazienti (21M, 19F) in trattamento emodialitico cronico trisettimanale (età media 59.2 ± 15.5 anni, età dialitica compresa tra 1 e 25 anni) sono stati sottoposti per 5 mesi a supplementazione con metiltetraidrofolato (30 mg endovena a fine seduta dialitica). Basalmente, dopo 2 mesi e a fine studio sono stati studiati i livelli di omocisteina, vitamina B12 e folati. I dosaggi di vitamina B12 (vn: 187.0-1059 pg/ml) e folati (vn: 3.5-16.1 ng/ml) sono stati eseguiti su analizzatore Axsym con metodica MEIA (metodo immunologico a cattura di microparticelle); l'omocisteina (vn 4.45-12.5 mcmol/L) è stata eseguita su analizzatore IMX con metodica FPIA (metodo immunologico a fluorescenza polarizzata). Apparecchi e reattivi sono forniti dalla ditta Abbott.

Risultati

I valori basali di omocisteina risultavano di 56.4 ± 46.4 mcmol/L; dopo 2 mesi dalla somministrazione di folati si osservava riduzione di quasi il 50% dei livelli plasmatici di omocisteina: 29.3 ± 11.5 mcmol/L ($P < 0.001$); successivamente i valori di omocisteina non mostravano significative variazioni 28.2 ± 7.3 mcmol/L (a fine studio). Si osservava un parallelo incremento dei livelli plasmatici di folati : da 2.53 ± 0.97 a 11.8 ± 4.3 ng/ml ($p < 0.001$) dopo 2 mesi, 11.1 ± 2.87 ng/ml dopo 5 mesi; un progressivo incremento di vitamina B12, con variazioni significative: da 365.7 ± 164.9 a 390.9 ± 170.2 pg/ml (2° mese) fino a 456.7 ± 176.4 pg/ml (5° mese).

Discussione e conclusioni

Sia due mesi che 5 mesi dopo la supplementazione tutti i pazienti hanno risposto positivamente alla terapia; non sono state trovate correlazioni significative tra livelli plasmatici di omocisteina ed età dialitica. I pazienti presentano elevati livelli di omocisteina per ridotta metabolizzazione a livello renale dell'aminoacido solforato e per deficit assoluto di folati. La somministrazione ad alte dosi di metiltetraidrofolato non è in grado di correggere l'iperomocisteinemia, pur normalizzando i livelli dei folati plasmatici; la riduzione dei livelli di omocisteina indica che la carenza di folati è tale da rendere necessarie periodiche supplementazioni. Prossimamente verranno valutati i valori di omocisteina, vitamina B12 e folati nei pazienti di questo studio a distanza di un anno dall'inizio della supplementazione, per valutare i risultati conclusivi. Per indicare una riduzione del rischio cardiovascolare correlabile alla diminuzione dei valori di omocisteina nel paziente in emodialisi sono necessari studi o valutazioni protratte nel tempo, utili nell'indicare al clinico l'andamento dei marcatori predittivi di patologie coronariche; l'omocisteina può essere uno di questi.

DIFFERENZE DEI LIVELLI PLASMATICI DI OMOCISTEINA TRA SOGGETTI DIABETICI DI TIPO 2 E CONTROLLI: RUOLO CONFONDENTE DELL'INFEZIONE DA HELICOBACTER PYLORI

Roberto Testa*, Stefano Cenerelli, Patrizia Bonazzi[#], Renato Galeazzi[#], Anna Rita Bonfigli*, Cristina Sirolla*, Sergio Giunta^o, Luciano Galeazzi^o, Daniele Fumelli, Ivano Testa.

Istituto di Medicina Interna, Università di Ancona; [#]Dipartimento di Gastroenterologia, Ospedale Regionale di Ancona; *Dipartimento di Ricerche Gerontologiche, INRCA, Ancona; ^oLaboratorio Analisi, INRCA, Ancona.

Scopo del lavoro

I dati presenti in letteratura non hanno ancora chiarito se il diabete mellito di secondo tipo (T2DM) possa indurre aumentati livelli plasmatici di omocisteina. La numerosità delle variabili in grado di influenzare i valori di omocisteinemia può essere la causa di tali controversie. Un'importante quanto negletta variabile potrebbe essere l'infezione da *Helicobacter pylori* la quale, nonostante sia nota la sua possibile associazione con elevati livelli di omocisteinemia e nel contempo sia presente con un'ampia prevalenza nella popolazione Caucasica (oscillante tra il 30 ed il 40%), non è stata mai considerata quale variabile confondente. Sulla base di tali osservazioni abbiamo voluto verificare se esistono differenze nei livelli plasmatici di omocisteina tra una popolazione di pazienti affetti da T2DM e un gruppo di controllo, considerando la presenza/assenza di *Helicobacter pylori*.

Materiali e Metodi

La popolazione presa in esame era costituita da un gruppo di pazienti diabetici tipo 2, senza complicazioni di malattia né ipertensione arteriosa sistemica (n=30, 55.7±9.7 anni) e da un gruppo di controllo (n=43, 51.2±11.3 anni). Su tali soggetti abbiamo valutato i principali parametri glicolipo-metabolici, la presenza di *Helicobacter pylori* mediante ¹³C Urea Breath Test, i valori di omocisteina plasmatica, di vitamina B₁₂ e folati, il polimorfismo genetico della metilentetraidrofolato reduttasi.

Risultati

Valutando complessivamente la popolazione presa in esame si possono rilevare differenze statisticamente significative di omocisteinemia solamente quando essa viene divisa considerando la presenza/assenza di *Helicobacter pylori* (14.0±6.5 vs. 10.6±4.7 μmol/l, rispettivamente, p<0.01), senza che siano presenti differenti concentrazioni delle vitamine esaminate né diverse frequenze del polimorfismo genetico della metilentetraidrofolato reduttasi. Significativa è risultata inoltre l'interazione tra presenza/assenza del diabete, omocisteina ed *Helicobacter pylori* (p<0.03), tenendo conto di tutti gli altri noti fattori confondenti (Diabetici *helicobacter pylori* negativi: 12.5±5.6 μmol/l, diabetici *helicobacter pylori* positivi: 13.6±5.8 μmol/l. Controlli *helicobacter pylori* negativi: 9.4±3.8 μmol/l, controlli *helicobacter pylori* positivi: 14.3±7.0 μmol/l).

Discussione e Conclusioni

Il T2DM sembra indurre *per se* livelli più elevati di omocisteina e tale dato risulta mascherato quando la presenza/assenza di infezione da *Helicobacter pylori* non venga indagata. Tale mascheramento indotto dall'*Helicobacter pylori* è quindi conseguenza del differente effetto che esso produce sui valori di omocisteinemia nei soggetti normali rispetto ai pazienti diabetici.

Screening del diabete gestazionale con il test di O'Sullivan: quale cut off?

M. Carta, D. Giavarina, G. Soffiati

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

SCOPO DEL LAVORO

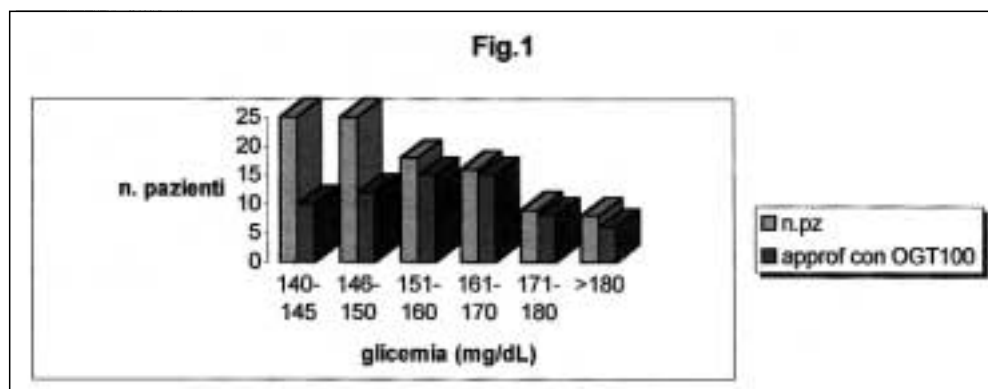
Le ultime raccomandazioni pubblicate dall'American Diabetes Association (ADA), prospettano la possibilità di utilizzare per il test di O'Sullivan (carico orale con 50 g di glucosio) un cut off più basso, ovvero 130 mg/dL (7,2 mmol/L) al posto di 140 mg/dL (7.8 mmol/L). Consigliando infatti l'approfondimento diagnostico a tutte le pazienti con una glicemia dopo 60' \geq 130 mg/dL si alzerebbe la sensibilità del test dall'80% al 90%. (1) Per cercare di verificare la fattibilità di tale approccio abbiamo eseguito una indagine relativa alla situazione attuale nel nostro laboratorio, dove si utilizza il cut off di 140 mg/dL.

MATERIALI E METODI

Abbiamo analizzato tutte le curve da carico orale di glucosio per os (50g) eseguite nelle gravide presso il nostro Laboratorio nei primi 5 mesi dell'anno, verificando quante tra le pazienti con un valore patologico (\geq 140 mg/dL al prelievo eseguito dopo 60' dal carico orale) si siano poi ripresentate presso il nostro laboratorio o presso il centro anti-diabetico o presso il Reparto di Ginecologia e Ostetricia per effettuare l'approfondimento diagnostico suggerito dall'ADA ovvero la curva da carico con somministrazione di 100 g di glucosio per os e prelievi fino alla 3^a ora.

RISULTATI

Nei primi 5 mesi del 2001 si sono eseguiti 514 test di O'Sullivan per lo screening del diabete gestazionale: l'età media delle pazienti era di 31.7 anni, la glicemia media di base era di 83 mg/dL, mentre la media del prelievo dopo 60' era di 119 mg/dL. 100 pazienti avevano una glicemia \geq 140 mg/dL. Di questi 100 pazienti solo 66 si sono poi sottoposte ad approfondimento diagnostico (63 con la curva da carico con 100 mg di glucosio per os e 3 con altri test (emoglobina glicata o glicemia postprandiale). Se però si analizza il comportamento delle pazienti sulla base del valore glicemico riportato a 60' dal carico, si può osservare che la percentuale di pazienti che approfondiscono con altre indagini è molto bassa per quelle pazienti che hanno riportato un valore patologico ma $<$ 145 mg/dL (40%) o compreso tra 145-150 mg/dL (48%), mentre cresce all'83% quando il valore glicemico riportato era compreso tra 150-160 mg/dL, e si stabilizza intorno al 90% per valori superiori. (Fig.1)



Discussione

Questa semplice analisi permette di fare alcune considerazioni: evidentemente i medici curanti ritengono opportuno l'approfondimento diagnostico solo di fronte a valori glicemici dopo 60' dal carico orale con 50 g di glucosio, superiori a 150 mg/dL. Per questo motivo non sembra opportuno abbassare il cut off del test di O' Sullivan a 130 mg/dL, ma piuttosto sembra necessario raccomandare l'approfondimento diagnostico in tutte le pazienti in cui la curva glicemica non risulta normale e non solo in quelle in cui è decisamente alterata.

Bibliografia

(1) American Diabetes Association: Gestational (Consensus Statement). Diabetes Mellitus, Diabetes Care, 24 (Suppl.1): S77-S79, 2001

**Origine dello stress ossidativo nelle famiglie dei diabetici insulino-dipendenti (tipo 1)
Presentazione preliminare**

Rossi L., Lucchetti A., Casini M.,*Fagnani F.,*Mariani S.,*Matteucci E.,*Giampietro O., Innocenti B.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, Azienda Ospedaliera Pisana

*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa

Scopo del lavoro

Il diabete insulino-dipendente (IDDM, tipo 1) è caratterizzato da insulinopenia, spesso associato a specifici antigeni HLA, con predisposizione ad abnormi risposte immunitarie inclusi fenomeni autoimmunitari, con anticorpi antiinsulina ed antiinsula; si manifesta ad ogni età, più frequentemente nei giovani.

Obiettivo della ricerca è l'individuazione delle cause del disequilibrio redox riscontrato nelle famiglie dei diabetici tipo 1 insulino-dipendenti. Essendo stati esclusi difetti delle riserve antiossidanti cellulari e delle difese extracellulari, rimane da investigare la possibilità di un difetto degli antiossidanti di membrana oppure, come probabile, di un'iperproduzione di radicali. In entrambi i casi l'indagine è preliminare alla futura programmazione di un intervento terapeutico con supplementi giornalieri di vitamine antiossidanti, per verificare se la tendenza ossidativa può essere corretta.

Materiali e metodi

Il protocollo, prevede lo studio di 40 diabetici tipo 1 insulino-dipendenti, dei loro familiari di primo grado non diabetici, scelti con criteri di inclusione predefiniti, e di un gruppo di 60 soggetti sani di controllo. La raccolta dei dati anamnestici, l'esame obiettivo e la valutazione dello stato cardiovascolare unitamente allo studio dei parametri ematochimici prevedono la collaborazione tra clinica, laboratorio di routine e laboratorio di ricerca.

Le analisi ematochimiche di routine comprendono: emocromo; glicemia, glicosuria, HbA1c, fruttosamina; AST, ALT, γ GT, bilirubina; colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, lipoproteina (a); PCR; clearances di azoto, creatinina, acido urico, albumina, sodio e potassio; fibrinogeno, attività protrombinica, PTT, D-dimero; vitamina B 12, acido folico.

Le indagini ematochimiche di tipo specialistico prevedono: l'analisi dei livelli circolanti delle vitamine C ed E; la tipizzazione linfocitaria; la valutazione delle citochine e dei loro recettori; la misurazione del controtrasporto Na-H eritrocitario; il dosaggio del glutatione (GSH) intraeritrocitario; la quantificazione del danno ossidativo alle strutture proteiche e cellulari mediante misurazione della fragilità osmotica eritrocitaria e dei livelli di AOPP plasmatici; la quantificazione del danno perossidativo lipidico di membrana mediante misurazione della concentrazione di malonaldeide nelle sospensioni eritrocitarie e nel plasma.

Discussione e conclusioni

Lo studio prospetta promettenti ricadute sia scientifiche che socio-sanitarie. L'ampiezza numerica della popolazione esaminata e l'approfondimento analitico strumentale previsto assicureranno il raggiungimento dell'obiettivo con un numero di dati inoppugnabile. Attualmente sono in corso indagini prevalentemente in ambito genetico ed immunologico; l'individuazione di nuovi fattori di rischio "familiari" potrebbe permettere di selezionare una batteria di esami semplici e di facile esecuzione in grado di individuare le famiglie che presentano una aggregazione di predittori di danno metabolico, cardiovascolare e renale ove programmare l'attuazione dell'opportuno intervento preventivo.