

RELAZIONI

**R01
CYTOKINES AND REGULATION OF IMMUNE RESPONSE**

T. Magrone¹, E. Jirillo²

¹*Immunology, Faculty of Medicine, University of Bari, Bari*

²*National Institute of Gastroenterology, IRCCS "S. de Bellis", Castellana Grotte, Bari*

Cytokines are cellular products able to modulate both innate and adaptive immune response.

In this context, we will place emphasis on the regulatory role of various cytokines at the intestinal level with special reference to inflammatory bowel disease (IBD). Finally, have focused our attention on the possible effect of nutraceutical products such as red wine polyphenols (Negroamaro), fermented grape marc (FGM), donkey's milk and, goat's milk, respectively in the regulation of inflammatory conditions.

In our in vitro experiments, we employed ELISPOT (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), ELISA (SuperArray Bioscience Corporation, D.B.A. Italia, Milan, Italy) and cytometric bead array (CBA Kit, Becton Dickinson, San Jose, CA) methods for cytokine detection.

In particular, peripheral blood mononuclear cells from human healthy donors were stimulated with Negroamaro, donkey's milk, and, goat's milk, respectively, whereas Peyer's patches cells of BALB/c mice were stimulated with FGM.

In conclusion, cytokines intervene in many pathological conditions, even including IBD and food- as well as age-related diseases, such as atherosclerosis.

Therefore, cytokines represent important drug targets to prevent and mitigate the development of a low inflammatory status, a common denominator of various pathologies.

Nutraceuticals may act on the cytokine network and, among them, polyphenols¹, dairy products as well as probiotics may represent new therapeutic approaches in cytokine-mediated diseases.

Reference

1. Magrone T, Candore G, Caruso C, et al. Polyphenols from red wine modulate immune responsiveness: biological and clinical significance. *Curr Pharm Des* 2008;14:2733-48

R02**IL LABORATORIO NELLA DIAGNOSI DELLE MALATTIE REUMATOLOGICHE**

P. Migliorini¹

¹*Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa*

Nel campo delle malattie autoimmuni sistemiche ancora più che in altri ambiti il contributo del laboratorio è essenziale per l'inquadramento diagnostico, la valutazione prognostica ed in alcuni casi anche per il monitoraggio della terapia.

La determinazione degli anticorpi anti-nucleo in immunofluorescenza indiretta costituisce a tutt'oggi il test di più ampia utilizzazione per la diagnosi di laboratorio delle malattie autoimmuni sistemiche. Per la sua esecuzione, attualmente viene raccomandato l'utilizzo di linee cellulari in coltura continua come substrato, poiché presentano una maggiore ricchezza in materiale cromatinico rispetto alle cellule di tessuti differenziati. L'utilizzo di linee cellulari sincronizzate in coltura permette inoltre l'espressione di antigeni presenti in tutte le fasi del ciclo cellulare e conseguentemente l'identificazione di specificità autoanticorpali non individuabili in sezioni di tessuto. Il risultato del test è espresso non solo in termini di positività o negatività ma anche in termini di pattern di reattività (omogeneo, periferico, nucleolare, punteggiato/speckled, anti-centromero), anche se non vi è un'associazione stretta tra pattern in immunofluorescenza e specificità anticorpale, con l'eccezione degli anti-centromero.

Gli anticorpi antifosfolipidi (APL) sono probabilmente il secondo gruppo di autoanticorpi per frequenza di determinazione. Costituiscono il marcatore sierologico della sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APLS), caratterizzata da trombosi arteriose e venose con conseguenti manifestazioni a carico di molti organi e apparati, incluso il sistema nervoso centrale e il distretto coronarico; nella donna, sono responsabili di infertilità, poliabortività ed eclampsia.

Gli APL sono una famiglia di autoanticorpi sierici, eterogenei per specificità ed affinità, ma tutti in grado di riconoscere fosfolipidi, proteine leganti i fosfolipidi o complessi fosfolipidi-proteine.

Gli APL oggi più comunemente ricercati sono il LAC, gli anticorpi anti-cardiolipina (ACLA) e gli anti- β 2GPI; il LAC viene ricercato mediante esami della coagulazione (infatti, si tratta di un anticorpo in grado di causare il prolungamento degli esami della coagulazione in vitro fosfolipido-dipendenti); gli ACLA e gli anti β 2GPI mediante metodiche ELISA che misurano la reattività immunologica rispettivamente verso la cardiolipina in un test β 2GPI-dipendente, o verso la β 2GPI isolata. La prevalenza degli APL, nei soggetti di controllo giovani apparentemente sani, è dell'1-5%, sia per ACLA che LAC; come per gli altri anticorpi, anche per gli APL la prevalenza aumenta con l'età, specialmente nei soggetti anziani con concomitanti malattie croniche.

Sono stati effettuati numerosi studi multicentrici per il confronto e la validazione dei test ELISA per ACLA e sono attualmente disponibili sieri standard e anticorpi monoclonali umani che consentono di esprimere il risultato dei test in unità internazionali ACLA-IgG o ACLA-IgM.

I risultati del test sono negativi se inferiori al limite superiore di norma (stabilito al 99° percentile di un gruppo di controlli); positivi bassi, se <30 GPL/MPL; positivi medi, se compresi tra 30 e 80 GPL/MPL; positivi alti, se > 80 GPL/MPL.

I criteri di classificazione aggiornati della APLS considerano significativi (e quindi fattori di rischio indipendenti) la positività al test del Lupus Anticoagulant, la dimostrazione di anticorpi a medio o alto titolo anti-cardiolipina β 2GPI-dipendenti (ACLA) di classe IgG o IgM e introducono l'utilizzo degli anticorpi anti- β 2glicoproteina I (anti- β 2GPI) di classe IgG o IgM come addizionale criterio di laboratorio.

Un terzo gruppo di autoanticorpi di più recente scoperta sta acquistando una sempre maggiore importanza: si tratta degli anticorpi anti peptidi/proteine citrullinate (ACPA).

E' da tempo nota la presenza nei sieri di artrite reumatoide dei cosiddetti anticorpi anti-cheratina, originariamente descritti come IgG che in immunofluorescenza si legano allo strato corneo dell'esofago di ratto. L'antigene contro cui questi anticorpi sono diretti è una proteina implicata nell'aggregazione dei filamenti di citocheratina, la filaggrina. La filaggrina è sintetizzata nelle cellule epiteliali come precursore fosforilato; durante la differenziazione delle cellule epiteliali, il precursore è defosforilato, subisce la rimozione proteolitica di parte della molecola e viene deiminato. Gli anticorpi anti-filaggrina sono responsabili anche della fluorescenza dei granuli perinucleari nelle cellule della mucosa buccale umana: anti-cheratina, anti-perinuclear factors e anti-filaggrina rappresentano quindi la stessa popolazione di anticorpi. Gli anticorpi anti-filaggrina non reagiscono con la proteina immo modificata ma con la forma in cui per azione dell'enzima peptidilarginindeiminasi alcuni residui di arginina sono trasformati in citrullina.

Peptidi derivati dalla filaggrina o da altre proteine, in cui un numero variabile di arginine sono sostituite da citrulline, sono ormai da alcuni anni comunemente utilizzati nella diagnostica serologica come substrati per la determinazione di ACPA. Gli ACPA sono considerati un marcatore sensibile e precoce di artrite reumatoide: di particolare interesse è infatti il riscontro di questi autoanticorpi all'esordio della malattia, quando ancora mancano le alterazioni radiologiche tipiche, il fattore reumatoide può essere negativo e le manifestazioni cliniche possono essere sufficientemente lievi da rendere difficile l'inquadramento diagnostico.

Dal momento che anticorpi di questa specificità sono assenti nei sieri di pazienti con altre malattie del connettivo e soprattutto in altre artriti croniche, la determinazione di ACPA rappresenta il metodo più specifico e sensibile per la diagnosi di laboratorio di artrite reumatoide e potrebbe essere presto inserito nei criteri sierologici per la diagnosi di questa malattia.

R03**LE CITOCINE COME INDICATORI DI ATTIVITA' DI MALATTIA NELL'ARTRITE REUMATOIDE**

F. Ingegnoli¹

¹*Dip. e Cattedra di Reumatologia, Università degli Studi di Milano, Istituto Gaetano Pini, Milano*

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica autoimmune che, oltre a colpire le articolazioni, determina spesso un interessamento sistemico. Attualmente, gli indici di flogosi sono importanti mezzi per monitorare l'attività di malattia e la risposta ai farmaci. La velocità di eritrosedimentazione (VES) e la proteina C reattiva (PCR) sono gli indici più frequentemente utilizzati sia nella pratica clinica che negli studi controllati. Essi sono correlati con altri indici di malattia e anche con la sua progressione radiologica. La PCR è più sensibile ai cambiamenti dell'infiammazione e meno sensibile a fattori extrainfiammatori, ad eccezione di quelli infettivi.

Numerose osservazioni sperimentali hanno dimostrato che il Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) è una citochina proinfiammatoria che svolge un ruolo chiave nell'AR. A elevate concentrazioni, il TNF- α è in grado di innescare una cascata di eventi infiammatori modulando la produzione di altri mediatori flogogeni quali l'interleuchina (IL) -1, IL-6, o di chemochine quali IL-8, nonché di favorire l'espressione di molecole di adesione intercellulare.

Queste sostanze sono oggi diventate il bersaglio per la terapia di patologie infiammatorie croniche quali l'AR, ed in alcuni casi è stato dimostrato che i loro livelli sierici correlano con i marker di attività di malattia come VES e PCR.

R04 N-GAL, UN BIOMARCATORE PRECOCE DI DANNO RENALE

C. Ronco¹

¹Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale San Bortolo, Vicenza

Molte sindromi critiche come la sepsi o l'infarto miocardico, sono spesso diagnosticate in ritardo a causa di una insorgenza clinica subdola o scarsamente ricca di sintomi. Tutto ciò ha un effetto importante sia sulla prognosi che sugli interventi terapeutici. Possiamo dire che se un danno interviene a livello molecolare e cellulare, l'evidenza clinica di tutto ciò si materializza con un significativo ritardo dal punto di vista fisiopatologico e l'orologio clinico della diagnosi risulta dunque in evidente ritardo rispetto a quello biologico del danno tissutale. Ma oggi vi è un altro orologio intermedio, che è quello dei segnali umorali derivanti dal danno biologico: sostanze che si riversano nel torrente circolatorio nelle fasi precoci della malattia e ne consentono l'evidenziazione ed una diagnosi precoce: I Biomarkers. Potenziali Biomarkers vengono individuati con tecniche di genomica e proteomica, vengono poi sviluppati tests affidabili per misurarne i livelli su sangue o urine, vengono condotti studi su larghe popolazioni per accertarne la validità clinica, ed infine vengono poi posti all'attenzione del clinico come strumenti di diagnosi. Un Biomarker è un componente biochimico che può essere misurato e valutato come un indicatore di un danno precoce ad un determinato organo. Come si scopre un biomarker? Utilizzando tecniche di cDNA microarray come tecniche di screening generali, è possibile individuare dei geni la cui espressione è aumentata nelle primissime ore del danno d'organo e la cui funzione è quella di produrre proteine che, una volta entrate in circolo, diventano preziosi "biomarkers". Un biomarker ideale deve essere molto sensibile (apparire precocemente), specifico (tipico di danno per l'organo bersaglio), facile da misurare, possibilmente al letto del paziente o con rapida ed economica analisi di laboratorio, deve offrire una ipotesi sulle cause del danno discriminando i vari tipi di patologie, deve correlare con la severità del danno e offrire una accurata prognosi anche in assenza dei classici sintomi (o molto prima che essi appaiano), deve essere in grado di guidare l'inizio della terapia (teragnostico) e possibilmente di valutarne gli effetti. I biomarkers sono risposte biologiche che appaiono in diversi momenti della malattia e, a seconda dei livelli di concentrazione, dovrebbero essere in grado di stabilire il percorso della sindrome, la sua storia naturale ed i possibili esiti clinici. Ad esempio, la sindrome coronarica acuta (Infarto cardiaco) può essere diagnosticata al pronto soccorso per un dolore toracico, accompagnato da anomalie dell'elettrocardiogramma e soprattutto per una alterazione di biomarkers come la Troponina o la creatin-fosforasi (CPK). Spesso, la specificità di una malattia ed il suo decorso clinico vengono proprio descritti da un pannello di biomarkers che costituisce così una vera e propria mappa temporale della progressione del danno, dell'effetto della terapia, e degli esiti clinici della sindrome. Un altro caso tipico è rappresentato dalla sepsi dove molecole come la procalcitonina e la proteina C attivata descrivono sia la gravità che l'origine della sindrome aiutando il clinico nella diagnosi e guidandolo nella terapia.

In conclusione, i biomarkers portano nuove speranze per una diagnosi precoce di numerose sindromi come l'infarto, l'insufficienza renale acuta e la sepsi. Requisiti essenziali sono una grande sensibilità e specificità, assieme ad una accurata capacità prognostica e teragnostica. La proteomica apre oggi nuove opportunità per l'identificazione di nuove molecole in diversi campi della medicina, sperando di poter regolare l'orologio della clinica sullo stesso fuso orario del danno biologico, migliorando così non solo la diagnosi, ma anche la prognosi e l'outcome clinico delle patologie gravi.

Biomarker	Sorgente campione	Cardiochirurgia	Nefropatia da contrasto	Sepsi Terapia intensiva	Trapianto di rene
NGAL	Plasma	Early	Early	Early	Early
Cyst-C	Plasma	Interm	-	-	Interm
NGAL	Urine	Early	Early	Early	Early
KIM-1	Urine	Interm	-	-	-
IL-18	Urine	Interm	Absent	Interm	Interm
NAG	Urine	Early	-	-	-
MMP-9	Urine	Early	-	-	-
NHE-3	Urine	-	-	Early	-
LFABP	Urine	Early	-	-	Early
NETRIN-1	urine	-	Early	Early	-

Tab. 1 Principali biomarkers di danno renale acuto e capacità predittive in particolari ambiti.

R05 N-GAL: ASPETTI ANALITICI E PROSPETTIVE D'IMPIEGO

C. Galli¹

¹Scientific Affairs Manager, Abbott Diagnostici, Roma

Generalità. La lipocalina granulocitaria associata alla gelatinasi (NGAL), o siderocalina, è una piccola molecola di quasi 25 kd che appartiene alla superfamiglia proteica delle lipocaline, proteine "inviate dalle cellule per riportare delle sostanze"¹ quali i siderofori, piccole molecole non proteiche contenenti ferro e coinvolte nella crescita e nella sopravvivenza delle cellule. Le attività cellulari di NGAL sono influenzate strettamente dai legami con recettori di membrana specifici di almeno due tipi, che giocano un ruolo fondamentale nell'endocitosi e destino cellulare di NGAL. In seguito all'interazione recettoriale, NGAL viene internalizzata o come sola proteina (apo-NGAL) o coniugata con siderofori (olo-NGAL). Le due forme della molecola espletano azioni differenti: olo-NGAL viene catturata nelle vescicole endosomiali e trasportata nel citoplasma, dove può rilasciare il complesso sideroforo-ferro, attivando così le funzioni cellulari ferro-dipendenti, mentre NGAL viene degradata o esportata nuovamente nello spazio extracellulare. Al contrario, apo-NGAL, dopo internalizzazione, è in grado di catturare il ferro intracellulare ed esportarlo all'esterno, meccanismo che, in condizioni particolari, può portare all'apoptosi².

NGAL e danno renale. Dopo le prime osservazioni sulle elevate concentrazioni di NGAL nel soprannatante di colture di granulociti attivati, si è notato che i livelli della molecola possono risultare elevati anche in malattie sistemiche non necessariamente associate con processi infettivi, confermando così che molti tessuti possono rilasciare NGAL come fattore di fase acuta che segnala una condizione di danno. Nei tubuli renali, lo RNA messaggero di NGAL aumenta entro poche ore dall'instaurarsi di un evento dannoso, il che suggerisce che questa proteina appartenga al gruppo, abbastanza limitato, di biomarcatori renali indotti da stress e coinvolti nei processi fisiopatologici del danno renale acuto. A livello sperimentale sono state dimostrate la sintesi ed il rilascio precoce di NGAL dopo somministrazione di cisplatino, agente notoriamente in grado di indurre necrosi tubulare, e lo stesso è stata riscontrato anche in pazienti trattati con questo farmaco che avevano sviluppato un danno renale; analogamente, una iperespressione sia di RNA che di proteina sono stati rilevati sperimentalmente in caso di danno renale ischemico. Nel primo studio clinico in questo campo³, condotto su 71 bambini sottoposti a bypass cardio-polmonare, solamente i 20 soggetti che erano andati incontro a danno renale acuto, definito classicamente in base all'aumento dei livelli di creatinina, avevano mostrato un aumento significativo di NGAL urinaria e sierica, già 2 ore dopo l'intervento, mentre l'incremento della creatinina era dimostrabile solo dopo 1-3 giorni. L'analisi multivariata ha confermato che la determinazione di NGAL nelle urine era il più potente fattore predittivo indipendente di severità del danno renale. Osservazioni successive hanno confermato questi dati sia in pazienti pediatriche che in adulti, e analoghi risultati sono emersi in altre situazioni cliniche in cui il danno renale acuto è un'evenienza frequente. Ad esempio, in una coorte di oltre 600 pazienti afferenti al pronto soccorso⁴, una singola determinazione di NGAL nelle urine consentiva di distinguere il danno renale acuto dalla situazione di normalità, dall'iperazotemia prerenale e dall'insufficienza renale cronica, e aveva inoltre un elevato valore prognostico.

Determinazione di NGAL. NGAL può essere rilevata con diverse tipologie di immunodosaggi con formato diretto, o a "sandwich", che utilizzano diverse combinazioni di anticorpi di cattura e rilevazione e, soprattutto, tecnologie differenti per la generazione di un segnale proporzionale alla concentrazione dell'analita. La possibile determinazione quantitativa mediante immunoblot è stata affiancata successivamente da un test immunoenzimatico convenzionale in micropiastra, da un test rapido e, del tutto recentemente, da un dosaggio automatizzato in chemiluminescenza; gli ultimi due metodi sono in grado di fornire un risultato in breve tempo, requisito indispensabile nelle situazioni di urgenza clinica. La determinazione di NGAL può essere effettuata sia su siero che su urine, ma quest'ultima matrice è senz'altro da preferire; l'AUC per NGAL urinaria è superiore sia per la maggiore specificità che per la possibilità di rilevare incrementi di maggiore entità ed in minor tempo. Applicazioni cliniche. L'esigenza clinica primaria soddisfatta dalla determinazione di NGAL è la diagnosi di danno renale acuto, in alternativa alla sola determinazione della creatininemia⁵. Le evidenze sin qui disponibili hanno infatti messo in evidenza sia un cospicuo anticipo temporale (picco dopo 2-4 ore dall'evento causale, contro le 24-48 ore della creatinina) che un aumento esponenziale della concentrazione di NGAL, soprattutto nelle urine, rispetto ai livelli basali, il che può consentire di valutare anche l'entità del danno e, dopo l'inizio della terapia, di continuare a misurarne i livelli come indice di miglioramento. NGAL potrebbe inoltre rivestire un ruolo prognostico, in quanto indice di danno in atto⁶, per il peggioramento della funzione renale in pazienti con nefropatie croniche.

Bibliografia

1. Goetz DH, Willie ST, Armen RS, Bratt T, Borregaard N, Strong RK: Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry* 2000; 39:1935-1941.
2. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P et al: Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:407-413.
3. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelley C et al: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365:1231-1238.

4. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, Sise ME, Canetta PA, Barash N et al: Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* 2008; 148:810-819.
5. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, Buemi M: Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis* 2008; 52:595-605.
6. Mori K, Nakao K: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 2007; 71:967-970.

**R06
LE VARIANTI DEL CODICE GENETICO E I NUOVI METODI DI INDAGINE**L. Persani¹¹*Laboratorio di Ricerche Endocrinologiche, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano e IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano*

La conoscenza del codice genetico ha portato in tempi molto brevi a una rivoluzione nel campo biomedico. Variazioni del codice genetico sono una delle principali cause della biodiversità e possono determinare la suscettibilità o rappresentare la causa diretta di numerose malattie. Tale numero è continuamente in espansione e comprende anche una lunga lista di malattie che non sono evidenti alla nascita, ma hanno un esordio tardivo anche in età adulta o avanzata. Variazioni del codice genetico sono in grado di spiegare anche differenze nella risposta terapeutica o nell'insorgenza di effetti indesiderati di un trattamento farmacologico. Per questi motivi la medicina predittiva attualmente si basa su una lista di esami genetici che è in continua espansione. Tale evoluzione rappresenta una delle principali conseguenze della scoperta del codice genetico umano, in quanto grazie a un esame eseguibile in poche ore siamo in grado di predire se un soggetto avrà o meno una determinata malattia tumorale o se potrà giovare o meno di un determinato farmaco per il suo trattamento. Tali progressi sono stati resi possibili grazie allo sviluppo biotecnologico che ha generato nuove tecniche in grado di discriminare alterazioni anche puntiformi del codice genetico con costi e tempi di esecuzione sempre più ridotti. In questa relazione verranno illustrate alcune delle tecniche utilizzate per lo screening di geni candidati (es. dHPLC, sequenziamento automatico, MLPA) applicate allo studio di malattie di interesse endocrinologico.

R07 EVOLUZIONE DELLE INDAGINI CITOGENETICHE

P. Finelli¹

¹Laboratorio di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, Istituto Auxologico Italiano, Milano

²Dipartimento di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Milano

La citogenetica umana è nata nel 1956 con la scoperta fondamentale che la normale cellula umana contiene 46 cromosomi. Da allora, la citogenetica e le nostre conoscenze sulla correlazione tra i difetti cromosomici e la patologia umana si sono incredibilmente espanse grazie ai molteplici progressi tecnologici.

Fino agli anni 90 l'analisi citogenetica veniva eseguita al microscopio dopo cultura delle cellule e colorazione dei preparati cromosomici con tecniche di bandeggio differenziale. Successivamente sono state introdotte le tecniche di ibridazione in situ fluorescente (FISH), che si avvalgono sempre del microscopio per l'osservazione dei segnali fluorescenti, ma sono in grado di monitorare riarrangiamenti submicroscopici coinvolgenti regioni più piccole della banda cromosomica la cui dimensione media è di circa 5 Mb. Più recentemente una nuova tecnica è stata introdotta basata sull'ibridazione comparativa di un DNA test e un DNA reference, marcati con due diversi fluorocromi, su un array costituito da una collezione di cloni od oligonucleotidi che coprono l'intero genoma umano (array-CGH). La risoluzione della tecnica dipende dal tipo di array utilizzato potendosi ottenere con array "full coverage" una risoluzione in grado di rilevare perdita o guadagno di sequenze geniche di regioni molto piccole (poche Kb). L'array-CGH ha permesso di evidenziare aberrazioni criptiche alla base di disordini costituzionali finora non inquadrabili, avviando l'identificazione di un numero sempre più ampio di patologie genomiche. Permette inoltre di analizzare cellule con riarrangiamenti estremamente complessi e cellule non proliferanti, ovvero di cui non siamo in grado di analizzare i cromosomi, inclusi i materiali d'archivio quali ad esempio tessuti tumorali in paraffina, con enorme ricaduta nella comprensione della tassonomia molecolare dei tumori. L'incorporazione dell'array-CGH nei servizi di citogenetica offre nuovi strumenti per l'ottimizzazione diagnostica, la predizione dell'evoluzione della malattia e in taluni casi la risposta al trattamento, e insieme solleva nuove problematiche (principalmente in diagnosi prenatale) oggetto di intensa discussione nella comunità scientifica.

R08
MARCATORI MOLECOLARI NELLA TIPIZZAZIONE TUMORALEM. Frattini¹¹*Laboratorio Diagnostica Molecolare, Istituto Cantonale di Patologia, Locarno, Svizzera*

Le numerose analisi genetiche hanno consentito di ottenere un'estesa caratterizzazione dei tumori a livello molecolare, determinando nel contempo un notevole incremento della conoscenza dei meccanismi legati all'insorgenza e della progressione tumorale e di quelli implicati nella resistenza ai farmaci chemioterapici.

A causa della sua frequenza e dell'aggressività, il cancro coloretale è stato oggetto di intensi studi ed è attualmente considerato il modello più conosciuto di cancerogenesi. Nell'ambito della caratterizzazione molecolare di questa neoplasia, diversi marcatori sono stati collegati alla prognosi o all'efficacia di trattamenti chemioterapici. Tuttavia, solo pochi di questi marcatori sono attualmente utilizzati direttamente nella pratica clinica: l'instabilità dei microsatelliti e il sequenziamento del gene K-Ras. L'instabilità dei microsatelliti è un fenomeno che si genera allorché i geni implicati nel meccanismo di riparo del DNA di tipo "mismatch-repair" non sono funzionanti. Tale alterazione si genera a seguito sia di ipermetilazione del promotore di tali geni che a seguito di mutazioni inattivanti le proteine codificate da tali geni. L'instabilità è osservata nel 15% dei tumori colorettali sporadici e nella quasi totalità dei pazienti con sindrome di carcinoma ereditario di tipo non-polipotico (HNPCC), caratterizzati da mutazioni germinali nei geni del "mismatch-repair". Pertanto, l'analisi dei microsatelliti rappresenta, unitamente alla valutazione immunostochimica delle proteine codificate dai geni mismatch-repair, un ottimo test per lo screening di familiarità per cancro coloretale. È stato inoltre osservato, nei tumori colorettali sporadici, che la presenza di instabilità dei microsatelliti rappresenta un fattore indipendente di prognosi favorevole ma anche un meccanismo di resistenza a trattamenti chemioterapici standard in adiuvante. Sono pertanto sempre più frequenti i pareri degli esperti che indicano come tale marcatore debba essere indagato in tutti i tumori colorettali.

Il gene K-Ras è un oncogene che viene costitutivamente attivato a seguito di mutazioni in siti specifici, tipicamente a livello del codone 12 e 13 (in cui più del 90% delle mutazioni è riscontrata). Sulla base del modello di insorgenza del tumore coloretale, il gene K-Ras è alterato nelle prime fasi della cancerogenesi. A seguito dell'introduzione di nuovi farmaci chemioterapici mirati (le cosiddette "targeted therapies"), tipicamente quelli che hanno come bersaglio il recettore per il fattore epidermico di crescita (EGFR), il sequenziamento del gene K-Ras ha assunto grande rilevanza diagnostica. Infatti è stato ampiamente dimostrato come la presenza di mutazioni iperattivanti nel gene K-Ras conferisca resistenza ai farmaci anti-EGFR nei pazienti con carcinoma coloretale metastatico. Questo dato è di particolare rilevanza, perché le mutazioni nel gene K-Ras rappresentano il primo marcatore con ruolo predittivo di una terapia il cui bersaglio non è il gene alterato. Sulla base degli studi condotti, la Food and Drug Administration (FDA) e l'European Medicines Agency (EMA) hanno indicato la necessità di determinare lo stato mutazionale del gene K-Ras prima di procedere alla somministrazione delle terapie contro EGFR.

R09
THE CLINICAL IMPACT OF HIGH SENSITIVE CARDIAC TROPONIN ASSAYS

P. Venge¹

¹*Dep. Clinical Chemistry and Pharmacology, University Hospital, Uppsala, Sweden*

Cardiac troponins are the preferred markers of myocardial injury and are used for the diagnosis of acute myocardial infarction (AMI), but also for prediction of outcome of patients suffering from the acute coronary syndrome (ACS). The use of cardiac troponins for outcome prediction has grown increasingly important and the common view today is that any elevation of cardiac troponins, for whatever cause, signifies a pathological process in the myocardium and is associated with an unfavorable outcome as to death or myocardial infarction. What is an elevated troponin level? How does an elevated level relate to the 99th percentile URL? Recent assay developments have allowed us to answer these questions, since these assays measure cardiac troponin I well below the 99th percentile. As to the second question it became apparent that the 99th percentile of the upper reference limit is highly dependent on the age distribution of the reference population with lower levels found in younger subjects and that intermediate levels i.e. below the 99th percentile for the entire cohort, but above the 99th percentile for the reference population <60 years of age were predictive of an adverse outcome as to death. In recent reports we extended these investigations. Thus, in a community-based study (PIVUS, Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors) on about one thousand apparently healthy 70 year old men and women we established the 99th percentiles for the AccuTnl assay (Beckman Coulter) in the entire cohort to be 0.044 µg/L (i.e. close to the 99th percentile of 0.04 µg/L established previously) whereas the 99th percentile was lowered to 0.028 µg/L if subjects with any sign of cardiovascular disease such as elevated levels of natriuretic peptides were excluded i.e. the healthiest part of the population. Different cut-offs were applied to the results of the FRISC II population, NSTEMI and unstable angina. The prediction of 5-year mortality applying various different cut-offs showed that the hazard ratio was not increased when the 99th percentile cut-offs were applied, whereas the hazard ratios increased by the application of lower cut-offs. The highest hazard ratios (3.2, 1.9-5.1 95% CI) were found with the 90th percentile cut-offs and independent of sex. This data suggest that applications of lower cut-offs offer clinical advantages and that assays with lower sensitivities might not be optimal for clinical purposes.

R10**-2pro-PSA: A NEW SUPPORT IN DIAGNOSIS OF PROSTATE CANCER**A. Semjonow¹¹*Department of Urology, Prostate Center, University of Münster, Münster, Germany*

Prostate specific antigen (PSA) is one of the most widely studied tumor markers and the only serological prostate related parameter that has been included in population based screening studies for prostate cancer. A recent publication of the largest randomized screening study showed a reduction of 20% for death of prostate cancer in the screening arm as compared to the control arm (Schroder et al., NEJM 2009), translating into an individual risk reduction of dying from prostate cancer from approximately 3% to 2.4%.

Nevertheless, the discussion concerning useful PSA cut-offs for the indication of biopsies is going on and an increasing number of experts promote the evaluation of PSA- kinetics (i.e. PSA-Velocity / PSA-Doublingtime) with rather small increments of PSA increase at very low absolute PSA concentrations.

-2pro-PSA has recently been shown to increase the diagnostic accuracy of serological tumor markers in the detection of prostate cancer. The ratio of -2pro/free PSA is superior to the ratio of free/total PSA and total PSA alone. Data generated concerning the preanalytical stability of -2pro-PSA should be taken into account if -2pro-PSA is being used under routine conditions.

R11 POINT OF CARE TESTING (POCT) IN EMERGENCY CHEST PAIN PATIENTS

G. Amodio¹, F. Di Serio²

¹*Cardiologia d'Urgenza "Azienda Ospedaliera Policlinico", Bari*

²*Patologia Clinica I "Azienda Ospedaliera Policlinico", Bari*

Early recognition is crucial for the management of patients with ACS . In patients with chest pain, it is important to perform an ECG in the first 10 min after the access in the emergency room: if the ECG shows ST elevation, reperfusion therapy (with thrombolytic or primary percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA)) is needed as soon as possible. Cardiac markers (included troponin) in this case can be under the decision limit, so in this group their measurement is not necessary for diagnosis. If the ECG does not show ST elevation, measuring cardiac markers is indispensable for diagnosis and treatment. In this case, the presence or absence of ECG abnormalities can be crucial for decision-making. In cases with typical symptoms and ECG abnormalities, if troponin values are high, only 1 measurement may be necessary for the diagnosis. In cases of normal troponin values, it is necessary to perform other measurements (at least 1 more) later; negative troponin values 12 h from the onset of chest pain virtually excludes ACS.

In the modern management of patients with ACS it is important to obtain a diagnosis as soon as possible. So, to shorten times from the blood sampling to the validated report (Turn around time (TAT) arm-to-report), it is indispensable to use POCT. In this way it is possible, under the supervision of a Central Laboratory (but without laboratory personnel) to perform measurements directly in emergency departments, avoiding transportation time and accelerating the diagnostic process. So, it is possible to significantly shorten TAT, to reduce length of stay in hospital (LOS) and to begin earlier treatment for ACS. However, implementing POCT in an emergency department is not simple because measurements of cardiac markers are performed by non-laboratory personnel; therefore, because continuous controls from the Central Laboratories are needed, POCT must be connected with a laboratory information system (LIS), and this may not be possible in all emergency departments.

R12

LA MISURA DELLA TIREOGLOBULINA NEL TUMORE DIFFERENZIATO DELLA TIROIDEG. Iervasi¹¹*Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa*

La misura della Tireoglobulina (Tg) sierica rappresenta un elemento chiave nel follow-up dei pazienti trattati per carcinoma tiroideo differenziato (CTD). La sensibilità e la specificità della metodica di dosaggio della Tg ne influenzano tuttavia significativamente l'effettiva utilità clinica.

La maggior parte dei pazienti con CTD risultano liberi da malattia dopo trattamento primario della neoplasia (tiroidectomia + radioablazione con ¹³¹I, quest'ultima quando necessaria) anche se 15% di essi manifesta nel tempo segni di persistenza/ripresa di malattia e 5% di essi muore per complicanze connesse alla malattia. Appare dunque critico che i protocolli di follow-up presentino un alto valore negativo predittivo (NPV) per ridurre al minimo gli esami non strettamente necessari ma al tempo stesso un alto valore predittivo positivo (PPV) per identificare i pochi pazienti con persistenza/ripresa di malattia.

Le più accreditate e recenti linee guida internazionali (europee e nordamericane) per il trattamento e monitoraggio dei pazienti con CTD indicano nella misura della Tg dopo stimolazione con TSH (sia essa endogena che esogena) quale determinazione di più elevata affidabilità e sensibilità clinica. Studi recenti sembrano tuttavia indicare che il monitoraggio nel tempo dell'andamento dei valori di Tg (misurati con saggi ad elevata sensibilità analitica, di II generazione) durante terapia con ormoni tiroidei di sintesi abbia un valore predittivo più elevato rispetto al singolo valore di Tg misurato durante stimolazione con TSH. Questa nuova strategia di follow-up dei pazienti con CTD, anche se molto promettente, non è a tutt'oggi universalmente riconosciuta e con un livello di evidenza tale da modificare i comuni protocolli di follow-up.

R13 UTILIZZO CLINICO DELL'EMOGLOBINA GLICATA

M. Nizzoli¹

¹Azienda USL di Forlì, Forlì

L'HbA1c è fin dal 1980 il principale indicatore del controllo glicemico del paziente diabetico; misura la glicazione dell'emoglobina, processo irreversibile e continuo per l'intero ciclo vitale del globulo rosso: vita media 120 giorni, emivita 60 giorni. Circa il 50% dell'aumento del valore di HbA1c è determinato dai livelli glicemici del mese precedente alla determinazione, il 25% dai livelli dei 30-60 giorni precedenti e il restante 25% da quelli dei 60-120 giorni precedenti alla sua misurazione. E' opportuna la determinazione al momento della diagnosi iniziale e successivamente nel decorso della malattia come valutazione dell'efficacia della cura. Tale prassi è il risultato di diversi studi clinici randomizzati come il Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) nel diabete di tipo 1, il U K Prospective Study (UKPDS) nel diabete di tipo 2, che hanno dimostrato una stretta correlazione tra grado di controllo glicemico, valutato in base ad una serie di misure dell'HbA1c e il rischio dello sviluppo e della progressione delle complicanze croniche del diabete. E' stato dimostrato che nei soggetti con HbA1c elevata il contributo della iperglicemia a digiuno e basale alla formazione dell'HbA1c è maggiore rispetto a quello apportato dalla post prandiale, mentre nei soggetti con valori dell'HbA1c prossimi al target sarebbe maggiore il contributo di quest'ultima. Qualora tuttavia il risultato dell'HbA1c non sia correlato con lo stato clinico del paziente e con i valori dell'autocontrollo glicemico, è opportuno prendere in considerazione le condizioni che modificano il turn over degli eritrociti, le varianti dell'emoglobina oppure condizioni cliniche particolari come l'insufficienza renale cronica avanzata. Se è stata dimostrata una correlazione tra grado di compenso metabolico e complicanze microangiopatiche, per cui dobbiamo perseguire dove è possibile valori di HbA1c vicino alla norma (HbA1c < 6.5-7%) per prevenire la retinopatia e la nefropatia, non altrettanto possiamo categoricamente per le complicanze macroangiopatiche, principale causa di mortalità e morbilità della popolazione con diabete di tipo 2. Infatti recenti studi randomizzati (ACCORD, ADVANCE, VADT) che hanno confrontato target di compenso glicemico intensivo rispetto a quello meno intensivo in popolazioni diabetiche con lunga storia di malattia e ad alto rischio cardiovascolare, hanno dato risultati deludenti e non di univoca interpretazione. Attualmente la comunità scientifica è favorevole nel proporre target di HbA1c individualizzati in relazione alla storia clinica e al grado e tipo di complicanze. Infine è bene avere presente che l'HbA1c è un indicatore esclusivamente quantitativo dell'esposizione glicemica, ma non è in grado di fornire indicazioni qualitative come la variabilità e l'escursione glicemica, e il rischio di sviluppare ipoglicemia. Sono oggetto di studio e validazione clinica alcuni indicatori qualitativi che derivano dall'automonitoraggio della glicemia mediante glucometri. In conclusione a tutt'oggi la determinazione dell'HbA1c rappresenta ancora un test insostituibile nella comune pratica clinica per trattare al meglio i nostri pazienti diabetici.

R14**PROGRESSI NELLA MISURA E NELLA STANDARDIZZAZIONE DELL'EMOGLOBINA GLICATA**A. Mosca¹¹*Università degli Studi di Milano, L.I.T.A. di Segrate, Milano*

Nel corso del 2007 un paio di eventi hanno rappresentato un punto di svolta nel lento processo internazionale di standardizzazione dell'emoglobina glicata. I documenti pubblicati relativamente a tali eventi (Diabetes Care 2007;30:2399-2400; Clin Chem Lab Med 2008;46:573-4) puntualizzano gli accordi raggiunti ed i compiti delle Società Scientifiche e dei produttori di Diagnostici. Nel corso del 2009 è stato raggiunto un accordo sulla implementazione in Italia della standardizzazione, secondo le raccomandazioni che sono state redatte da un gruppo di esperti, delegati da varie associazioni e società scientifiche italiane (Biochimica clinica 2009;33:258-61). L'approccio seguito è quello della International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), basato sulla riferibilità metrologica. Sono stati definiti i traguardi per l'errore totale (6,7%) e per l'imprecisione (CV \leq 2,0%) e sono state introdotte le unità S.I. (mmol/mol). Nel corso dell'intervento si chiarirà la razionale del processo, e si definiranno le modalità e la tempistica per la nuova refertazione.

R15
ORMONI STEROIDEI E FUNZIONE ENDOCRINA DEL CUOREA. Clerico¹¹Dip. di Medicina di Laboratorio, Fondazione Toscana G. Monasterio e Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

I peptidi natriuretici (ANP, BNP e CNP) e l'urodilattina, costituiscono una famiglia di ormoni peptidici caratterizzati a livello molecolare dalla presenza di un anello con un ponte di cisteina e a livello fisiologico da effetti simili. ANP e BNP sono prodotti e secreti prevalentemente (ma non esclusivamente) dai cardiomiociti e costituiscono i principali effettori ormonali della funzione endocrina del cuore nei mammiferi.

I peptidi natriuretici cardiaci (PNC) posseggono azione diuretica, natriuretica e vasodilatatrice ed, inoltre, hanno azione inibitoria sulla contrazione dei cardiomiociti, come anche su fenomeni quali il rimodellamento cardiaco, la risteno post-angioplastica o altri processi infiammatori a carico del miocardio e delle cellule muscolari lisce. I PNC costituiscono una famiglia di peptidi con funzioni endocrine, paracrine, autocrine, neuro-trasmittitrici ed immunomodulatorie. La funzione endocrina cardiaca risulta quindi strettamente integrata con gli altri sistemi regolatori dell'organismo, compresi tutti i principali sistemi endocrini. La scoperta di questa stretta connessione fra la funzione endocrina cardiaca ed i principali sistemi regolatori dell'organismo, ha favorito una più approfondita comprensione dei processi fisiopatologici responsabili delle malattie cardiovascolari.

I livelli circolanti di ANP e BNP sono strettamente correlati sia con l'età che con il sesso. La concentrazione plasmatica dei PNC è sostanzialmente uguale nei due sessi, mentre durante l'età puberale i livelli circolanti di BNP aumentano progressivamente nelle adolescenti e raggiungono con la piena maturazione sessuale valori che sono nelle donne, con normali cicli ovarici, significativamente più elevati di quelli degli uomini di pari età. Dopo i 55 anni, i valori di BNP tendono significativamente e progressivamente ad aumentare in entrambi i sessi. Questi dati suggeriscono che gli steroidi sessuali svolgono una potente azione di regolazione sulla produzione/secrezione di ANP e BNP nell'uomo. Alla luce dei pochi dati fino ad ora disponibili, si potrebbe quindi suggerire, almeno come ipotesi di lavoro, che la produzione/secrezione dei PNC da parte dei cardiomiociti sia regolata dal rapporto fra estrogeni ed androgeni, mostrando prevalentemente gli steroidi sessuali femminili un'azione di stimolo, mentre gli androgeni un'azione inibitrice.

È noto che le donne presentano durante il loro periodo fertile un diminuito rischio cardiovascolare, rispetto agli uomini di pari età, per poi mostrare dopo la menopausa un aumento dell'incidenza di eventi cardiovascolari; fatto che in molti hanno cercato di attribuire prevalentemente all'azione degli estrogeni. La scoperta dell'azione "cardioprotettiva" dei PNC e dei livelli più elevati nelle donne in età fertile rispetto al sesso maschile ha suggerito un'ipotesi fisiopatologia per spiegare l'incidenza meno elevata di eventi cardiovascolari del sesso femminile prima della menopausa. Tali effetti protettivi contrastano l'azione del sistema simpatico, del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAA), delle endoteline e di alcune citochine che promuovono meccanismi in grado di causare ipertensione, disfunzione endoteliale, obesità e diabete di tipo II, cioè il quadro classico della sindrome metabolica. Di fatto i PNC mostrano effetti simili ai farmaci comunemente utilizzati nella terapia dell'ipertensione, dell'angina e dell'insufficienza cardiaca, come gli antagonisti del sistema RAA (ACE inibitori o bloccanti il recettore dell'angiotensina II), i diuretici (dell'ansa o anti-aldosteronici), i beta-bloccanti ed i vasodilatatori.

**R16
ANDROGENI E RISCHIO CARDIOVASCOLARE****M. Maggi¹**¹*Università di Firenze, Firenze*

Diverse evidenze epidemiologiche hanno sottolineato il fatto che la disfunzione erettile (DE) rappresenti il sintomo di diverse condizioni cliniche misconosciute come il diabete mellito, l'ipertensione, la sindrome metabolica e la depressione. Inoltre, è stato suggerito come la DE possa essere considerato come il primo segno di una patologia coronarica silente specie nella popolazione diabetica, indipendentemente dal controllo glicometabolico e dalla severità della DE stessa. L'ipogonadismo è frequentemente associato alla sindrome metabolica sia in soggetti con sia in quelli senza DE. L'insulino-resistenza sembra rappresentare il meccanismo patogenetico comune tra DE ipogonadismo e sindrome metabolica. In soggetti con DE l'ipogonadismo può peggiorare il disturbo sessuale in relazione alla possibile associazione con una riduzione della libido e sintomi depressivi. Inoltre, ipogonadismo di per sé è stato associato ad un maggior rischio di mortalità e morbilità cardiovascolare.

Pertanto l'ipogonadismo, la DE, l'insulino-resistenza e la SM sono condizioni cliniche frequentemente associate nello stesso individuo. Questo gruppo di affezioni è caratterizzato da un aumentato rischio di sviluppare patologie cardiovascolari e metaboliche, con un impatto rilevante non solo sulla qualità ma anche sull'aspettativa di vita dei pazienti. Nei pazienti con DE tale sintomo offre l'occasione per approfondire, trattare o prevenire patologie sottostanti potenzialmente pericolose. Sebbene risultati preliminari possano suggerire una riduzione del rischio CV dopo terapia sostitutiva con testosterone, sono necessari ulteriori studi per poter confermare i risultati incoraggianti attualmente disponibili.

R17

ALDOSTERONE E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

P. Mulatero¹, C. Bertello¹, S. Monticone¹, D. Tizzani¹, A. Iannaccone¹, S. Abram¹, F. Veglio¹

¹*Medicina Interna 4 e Centro Ipertensione, Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale, Università di Torino*

Negli ultimi quindici anni un notevole numero di studi a gettato una nuova luce sul ruolo dell'aldosterone nella patogenesi delle patologie cardiovascolari. E' diventato evidente che l'aldosterone, in aggiunta ai noti effetti di induzione del riassorbimento di sodio e perdita di potassio a livello renale, agisce anche attraverso effetti non-epiteliali quali l'induzione di infiammazione, fibrosi e necrosi in vari organi. Quindi parte degli effetti patogeni dell'aldosterone non sarebbero mediati dagli effetti sui livelli pressori. Questi dati ricavati prevalentemente da studi sul modello animale, hanno trovato un corrispettivo clinico nella dimostrazione che pazienti con iperaldosteronismo primitivo sviluppano un aumentato numero di eventi cardio- e cerebrovascolari rispetto a pazienti con ipertensione essenziale con simile profilo di rischio.

Questi eventi sono preceduti da un aumentata prevalenza di danno d'organo cardiaco (ipertrofia ventricolare sinistra, disfunzione diastolica, insorgenza di aritmie ecc.) vascolare (incremento dello spessore intima-media, aumento della componente fibrotica), renale (aumento della microalbuminuria, deterioramento della funzione renale) e di sindrome metabolica, sostenuta prevalentemente da un aumento dell'insulino-resistenza.

R18 DIAGNOSTICA DELLA DISPEPSIA: NOVITA' DAL LABORATORIO

L. Lombardo¹

¹S.C. Gastroenterologia Ospedale Mauriziano U.I., Torino

La dispepsia funzionale è un disturbo del tratto gastroenterico superiore caratterizzato da dolore epigastrico, nausea e altre sensazioni "sgradevoli" non sempre esattamente precisabili, localizzate all'epigastrio, in assenza di patologie organiche.

La dispepsia funzionale rende conto di un'alta percentuale dell'impegno del Medico di Famiglia e dello Specialista Gastroenterologo, variando con l'area geografica, età, sesso e cultura, ma valutabile comunque dal 20% al 30% del totale delle visite ambulatoriali. Questo dato, insieme alla natura cronica/ricorrente del disturbo, e alla necessità di escludere lesioni organiche con un numero elevato di esami, è alla base di un impegno economico e sociale rilevante.

Gli esami ad oggi a disposizione del Medico per affrontare tale problematica sono numerosi, ma spesso deludenti e poco utili in senso diagnostico positivo: Esami ematologici di routine, Rx del Tubo Digerente, Esofagogastroduodenoscopia, Ecografia addominale, TAC addominale, RM etc

Alcuni di questi, nella pratica corrente si sono rivelati pressoché inutili nella gran maggioranza dei casi (Rx del Tubo digerente, ecografia addominale), altri sono raramente usati (TAC e RM), altri offrono raramente occasione di intervento efficace medico (esami ematologici di routine). Di solito pertanto il Medico, in questo caso, prescrive l'esame endoscopico, che tuttavia oltre a essere relativamente invasivo, è anche di scarso-nullo ausilio diagnostico, rivelando un reperto di "normalità" in almeno il 30% dei casi e una pressoché costante assenza di patologia rilevante, di tipo neoplastico, al di sotto dei 45 anni di età e in assenza di "sintomi di allarme".

Le linee guida della Società Italiana di Endoscopia Digestiva consigliano pertanto l'esofagogastroduodenoscopia solo in presenza di sintomi di allarme e al di sopra dei 45 anni di età (1).

In tutti gli altri casi (età < 45 anni; assenza di sintomi come calo ponderale, anemia, emorragia, vomito incoercibile) l'endoscopia non trova corretta indicazione.

Recentemente si è reso disponibile un panel di parametri sierologici per la valutazione della funzionalità gastrica, che offre il vantaggio di essere non invasivo, ripetibile e affidabile, il Gastropanel(2).

Il Gastropanel è un test sierologico, che attraverso l'analisi combinata di 4 parametri (Gastrina G17, Pepsinogeno I, Pepsinogeno II, Ab-Hp) è in grado di fornire, attraverso un semplice prelievo di sangue, diagnosi di tipo "istologico" come:

- Gastrite cronica atrofica diffusa
- Gastrite cronica atrofica del corpo
- Gastrite cronica atrofica dell'antro
- Gastrite ipersecretrice Hp-correlata.
- Normalità della mucosa gastrica

Tale ausilio diagnostico è particolarmente utile:

- Nei casi in cui i pazienti rifiutano l'esame endoscopico: può rappresentare un primo approccio per diagnosi di precancerosi come l'atrofia gastrica, che può fornire, in un secondo momento, elementi di maggior convinzione al paziente per eseguire l'esame endoscopico corredato delle necessarie biopsie. La diagnosi di atrofia gastrica è importante in quanto può aiutare a prevenire l'insorgenza del cancro gastrico, che rappresenta la seconda causa di morte dovuta a tumori, su base mondiale. Una percentuale infatti di gastrite cronica atrofica può regredire con la cura efficace dell'infezione da *Helicobacter pylori* (3).
- Nel 30% dei casi di EGDscopie che hanno dato esito di "Normalità" sia all'esame endoscopico-istologico che al Gastropanel, nei soggetti giovani (<45 anni) "senza sintomi di allarme". Tale risparmio di esami può essere rilevante a livello di organizzazione dei Centri Endoscopici (miglioramento della appropriatezza dell'esame e accorciamento delle liste di attesa) con rilevanti ripercussioni positive anche a livello socio-economico (riduzione dei costi sociali per esami non utili).

E' di interesse pratico che in un recente studio italiano, la prevalenza della gastrite cronica atrofica localizzata al corpo - fondo è risultata del 10.7% e che il 12% dei pazienti con gastrite cronica atrofica è di età <30 anni (4).

In conclusione, una mole crescente di lavori attesta la validità del Gastropanel nella diagnosi della gastrite atrofica, con prevedibili importanti ricadute sulla prevenzione del cancro gastrico. Tale esame pertanto riveste le caratteristiche per un impiego appropriatamente diffuso nella popolazione dispeptica.

Bibliografia

1. Buri I et al. Linee guida dell'appropriatezza e modelli predittivi per la selezione dei pazienti inviati per la gastroscopia. XV Congresso Nazionale delle Malattie Digestive, Milano 28 marzo-1° aprile 2009.
2. Sipponen P et al. Serum levels of deamidated gastrin-17 and pepsinogen I in atrophic gastritis: an observational case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:785-91.
3. Di Mario F et al. Recovery of gastric function after *H. pylori* eradication in subjects with body atrophic gastritis: prospective 4-year study. *J Gastroenterol Hep* 2005;20:1661-6.
4. Lombardo L et al. Atrophic gastritis phenotypes diagnosis using gastropanel test: Piedmont experience. XV Congresso Nazionale delle Malattie Digestive, Milano 28 marzo-1° aprile 2009.

R19

CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI: CARATTERISTICHE DELLA METODOLOGIA ED APPLICAZIONI CLINICHEM.T. Sandri¹¹Unità di Medicina di Laboratorio, Ist. Europeo di Oncologia, Milano

La ricerca di cellule tumorali circolanti (CTC) nel sangue periferico di pazienti affetti da tumori maligni è un argomento che rappresenta un interessante campo di ricerca da più di un secolo: la prima segnalazione risale infatti al 1869, ad opera di un patologo austriaco che descrisse la presenza di CTC su uno striscio di sangue effettuato prelevando il campione da un paziente deceduto per una neoplasia epiteliale. Le CTC rappresentano il primo passo nel processo di metastatizzazione per via ematogena, e il loro studio può permettere una migliore comprensione della biologia del tumore e delle metastasi stesse. Il primo problema che ha dovuto essere affrontato in questo ambito è relativo alla messa a punto di metodiche riproducibili e sufficientemente sensibili e specifiche per la rilevazione delle CTC: esse sono infatti un evento molto raro (1 CTC ogni 105-7 cellule mononucleate del sangue) e diversi approcci tecnologici sono stati utilizzati, disegnati però in maniera così diversa da impedirne la confrontabilità. Ad oggi l'attenzione si è ristretta su due tipi di metodiche: la prima prende in considerazione l'analisi degli acidi nucleici per la rilevazione di alcune sequenze o geni differenzialmente espressi nelle cellule tumorali e nei componenti del sangue, la seconda utilizza la citofluorimetria, che mediante metodi immunocitochimici permette la identificazione e la caratterizzazione delle singole cellule tumorali. Dato però il numero esiguo di CTC presenti, molto spesso la fase di identificazione viene preceduta dall'arricchimento del campione.

Arricchimento del campione. Diversi sistemi possono essere impiegati:

- La filtrazione, tramite la quale il sangue viene fatto passare attraverso dei filtri con pori del diametro di 8µm: questo permette di separare i piccoli leucociti dalle cellule epiteliali, ma si può avere una contaminazione da leucociti di grandi dimensioni o altre cellule mononucleate.

- La separazione per gradiente: si basa sulla diversa densità delle CTC e delle cellule mononucleate (<1.077 g/ml) rispetto alle cellule ematiche (>1.077 g/ml). Tuttavia anche questo metodo non è ottimale in quanto le CTC possono facilmente venir perse nel processo.

- Arricchimento immunomagnetico. Rappresenta la metodologia più efficace. Usando questo metodo le CTC vengono catturate grazie ad una selezione positiva tramite nanoparticelle magnetiche sulle quali sono adesi anticorpi diretti verso antigeni epiteliali (come citocheratine o molecole di adesione) o verso antigeni tumore specifici (come CEA o HER2). Le cellule catturate vengono poi separate tramite il passaggio attraverso un campo magnetico. Talora viene effettuato anche un processo di selezione negativa mediante l'aggiunta di un anticorpo anti-CD45 per eliminare i leucociti. Tramite questo sistema di arricchimento le CTC vengono preservate, tuttavia è possibile avere contaminazioni per l'espressione di marcatori epiteliali in cellule non-epiteliali. D'altra parte, le cellule possono non essere catturate se non esprimono il marcatore utilizzato per il processo di arricchimento.

Identificazione delle CTC. Come detto, i metodi utilizzati per l'identificazione delle CTC sono fondamentalmente basati su tecnologie di biologia molecolare o sull'utilizzo della citofluorimetria.

Metodi basati sulla ricerca di acidi nucleici. Mediante questo approccio, caratterizzato da una elevata sensibilità, le cellule vengono identificate tramite la ricerca di geni specifici delle cellule dell'organo dal quale origina il tumore. La tecnologia più utilizzata è la RT-PCR mediante la quale viene amplificato un mRNA target. Diversi marcatori sono stati utilizzati, e per migliorare sia sensibilità che specificità viene oggi preferita la ricerca contemporanea di più markers. Sussistono tuttavia delle limitazioni che possono interferire sulle performance di questi metodi, come la necessità di effettuare una lisi delle cellule che quindi rende impossibile la loro conta, la possibilità di falsi positivi per amplificazione di acidi nucleici liberi nel sangue o per la scarsa specificità del marker, la possibilità di falsi negativi dovuta alla non espressione del marcatore da parte delle CTC. Metodi citometrici. I metodi citometrici si basano sull'isolamento e la conta delle CTC mediante anticorpi monoclonali diretti verso antigeni epiteliali specifici. Tramite questi metodi l'integrità della cellula è conservata e le cellule possono essere ulteriormente analizzate e caratterizzate. Il principale problema con questi metodi è il "target": non esistono anticorpi specifici, e quelli più usati sono diretti verso le citocheratine, che tuttavia possono legare in maniera aspecifica le cellule del sangue, diminuendo così la specificità della tecnologia. Per risolvere in parte questo problema viene aggiunto anche un anticorpo anti CD45 che dovrebbe legare solo i leucociti rendendone possibile la evidenziazione e la esclusione dalla conta.

Diversi metodi sono stati sviluppati con questo approccio, come il sistema FAST (Fiber-optic Array Scanning Technology) il sistema LSC (Laser Scanning Cytometer) o il sistema ACIS (Automated Cellular Imaging System).

Molti sforzi sono stati focalizzati allo sviluppo di un sistema automatizzato che permettesse sia l'arricchimento che la rilevazione delle CTC nel campione di sangue, in modo da poter trasferire il metodo anche nella pratica clinica. Di recente è stato introdotto il sistema CellSearch (Veridex, Raritan NJ): si tratta di un sistema semi-automatico tramite il quale, dopo un arricchimento immunomagnetico effettuato grazie alla presenza di nanoparticelle ricoperte da anticorpi anti EpCAM, le CTC vengono colorate mediante anticorpi anti-citocheratine (CK) 8, 18, 19 e mediante un colorante per gli acidi nucleici (4',6-diamino-2-fenilindole, DAPI): le cellule che risultano CK+/DAPI+/CD45- vengono classificate e contate come CTC. Ad oggi questo metodo è l'unico approvato dalla FDA americana per il monitoraggio di pazienti con tumori metastatici della mammella, del colon-retto e della prostata.

Nuove tecnologie si stanno affacciando: ad esempio un approccio molto promettente sembra essere quello del sistema "CTC-chip", che consiste in un chip tramite il quale le cellule EpCAM positive vengono catturate e rilevate tramite delle telecamere che le riconoscono grazie alla loro morfologia, alla vitalità e all'espressione di marcatori.

Prospettive future.

Oltre alla rilevazione e alla conta delle CTC, un campo in attivo fermento è quello relativo alla loro caratterizzazione, che potrà permettere di ottenere informazioni più dettagliate sulla biologia del tumore: infatti le CTC possono rappresentare una "biopsia in vivo" che può arricchire le conoscenze di un determinato tumore. In particolare vi sono segnalazioni relative a variazioni delle caratteristiche tra il tumore primitivo e la successiva metastasi, dalla quale le CTC potrebbero essere rilasciate, in particolare per quel che riguarda espressione di recettori ormonali o di HER2, e questo avrebbe un impatto importante nella gestione delle pazienti in quanto vengono somministrate terapie mirate a seconda del fenotipo recettoriale del tumore primitivo anche in caso di malattia metastatica. Inoltre molti gruppi stanno lavorando per cercare di valutare se all'interno delle CTC vi siano anche cellule con caratteristiche di staminalità, caratteristiche che oggi vengono guardate con estremo interesse nell'ottica di migliorare le terapie: infatti malgrado la chemioterapia sia efficace nel distruggere la massa tumorale, essa si rivela talora inefficace nel lungo periodo, forse perché non agisce sulla popolazione di cellule tumorali con caratteristiche di staminalità, responsabili della persistenza e ripresa della malattia.

Pertanto nei prossimi anni non solo la conta ma soprattutto la caratterizzazione delle CTC potrà forse permettere di conoscere meglio il tumore e di gestire i pazienti in maniera più accurata e individualizzata.

R20**CTC UN NUOVO STRUMENTO PER LA GESTIONE DEL PAZIENTE ONCOLOGICO**S. Grisanti¹¹U.O. Oncologia Medica, A.O. Spedali Civili di Brescia, Brescia

Background. L'elemento teorico su cui si basa la tecnologia delle cellule tumorali circolanti (CTC) è rappresentato dal fatto che in un organismo adulto sano, la presenza di cellule epiteliali nel sangue periferico deve essere considerato un evento rarissimo. Questo vuol dire che in condizioni fisiologiche e con le attuali tecniche di indagine, non si riescono ad identificare cellule con caratteristiche epiteliali nel sangue periferico. Al contrario, nel paziente con neoplasia solida, la presenza di cellule tumorali nel sangue periferico (leucemizzazione di una neoplasia solida) è stata descritta da tempo. Nel lavoro di Cristofanilli e coll. [1] su 522 soggetti, di cui, 145 soggetti sani (n=145), 200 con patologie benigne della mammella (n=200) e 177 con carcinoma mammario metastatico (n=177), la percentuale di pazienti con ≥ 5 CTC nel sangue periferico è risultata pari a 0% nei primi due gruppi e del 49% nel gruppo metastatico. La presenza di CTC nel sangue periferico distingue, quindi, il sano dal paziente con neoplasia avanzata. Essa può essere documentata mediante diverse tecniche e tende ad aumentare col carico di malattia e nelle fasi cliniche più avanzate. Infatti, il passaggio di una cellula tumorale dalla sede iniziale del tumore nel torrente circolatorio rappresenta il primo momento del complesso meccanismo di formazione di tumori a distanza che è la metastatizzazione.

Il sistema CellSearch. La realizzazione del sistema CellSearch (Veridex LLC, NJ, USA) ha rappresentato un importante passo avanti nell'applicazione clinica delle CTC grazie al fatto che, essendo la tecnologia semiautomatica e la lettura delle CTC basata su criteri univoci, permette la standardizzazione dei risultati fra laboratori e fra osservatori diversi. Per questo motivo, il sistema CellSearch è il primo sistema di identificazione e quantificazione delle CTC, validato dalla FDA americana per l'uso clinico in tre neoplasie metastatiche: il carcinoma della mammella, il carcinoma del colon-retto ed il carcinoma della prostata. In Europa, ad oggi, nessun sistema sanitario nazionale prevede la rimborsabilità della determinazione delle CTC. Ricerca clinica. L'utilità clinica delle CTC risiede nel loro valore prognostico e predittivo di risposta alla terapia. La sopravvivenza globale (OS) e quella libera da progressione (PFS) sono significativamente inferiori nei pazienti con livelli di CTC superiori al cut-off. Inoltre, la misurazione delle CTC all'inizio di una linea di chemioterapia e nel corso di essa, fornisce un'informazione dinamica e "real-time" della sua efficacia. Nei pazienti, che nel corso di una chemioterapia, ottengono una riduzione delle CTC rispetto al valore basale, hanno una prognosi sovrapponibile a chi all'inizio del trattamento aveva meno cellule del cut-off. Viceversa, i pazienti che presentano un incremento delle cellule rispetto al valore basale, sono gravati da una prognosi infausta a breve, espressione dell'incapacità del trattamento di controllare la malattia metastatica. Un ulteriore aspetto applicativo clinico delle CTC, riguarda il fatto che risultano un indicatore più precoce e più affidabile delle tradizionali indagini di imaging e dei marcatori tumorali [2].

Conclusioni e prospettive. Le CTC aprono nuovi ed interessanti scenari della ricerca biologica e clinica delle neoplasie, molti dei quali completamente inesplorati. Non è noto, per esempio, se le CTC presentano lo stesso fenotipo della neoplasia di partenza, se si trovano in uno stato proliferante o apoptotico e, se, caratteristica ancora più importante, sono tumorigeniche e dunque responsabili della crescita a distanza. In ambito clinico, una delle prospettive della misurazione delle CTC nell'ambito metastatico è rappresentata dalla possibilità di modificare il trattamento chemioterapico, dinamicamente, in funzione della variazione dinamica del livello di CTC. Inoltre, non è ancora definito se le CTC sono presenti e quale ruolo hanno nella fase neoadiuvante (malattia localmente avanzata, non operabile alla diagnosi) o nella fase adiuvante (malattia operata) [3]. Infine, deve essere esplorata la possibilità che anche altre neoplasie, oltre ai carcinomi mammario, prostatico e colo-rettale, possano avere CTC. In tutti questi ambiti, le CTC potrebbero divenire un nuovo strumento diagnostico e di monitoraggio ed un potenziale target terapeutico e di chemioprevenzione.

Bibliografia

1. Cristofanilli M. et al. NEJM 2004;351:781-91
2. Budd GT. et al Clin Cancer Res 2006;12(21):6403-09
3. Rack B. et al. Proc. ASCO Meeting 2009, J Clin Oncol 2009;27:abstr 554

R21

VERSACELL: UN NUOVO APPROCCIO AL CONSOLIDAMENTO IN IMMUNOMETRIAG. Vignati¹¹UOS Centro Malattie Endocrine e Metaboliche, Osp. "G. Fornaroli", Magenta (MI)

Le tendenze organizzative che stanno caratterizzando i laboratori di qualsiasi dimensione sono orientate verso percorsi finalizzati a processi di integrazione tra laboratori (con conseguente ridimensionamento e/o chiusura di molte strutture) e di consolidamento strumentale del maggior numero possibile di analiti su piattaforme strumentali di medie-grandi dimensioni. Lo schema al momento più utilizzato, particolarmente in laboratori caratterizzati da carichi di lavoro significativi, sembra privilegiare soluzioni di Total Laboratory Automation (TLA); in genere affidate ad un unico fornitore che si deve far carico di tutte (o quasi) le tipologie di analiti eseguiti dal laboratorio. Risulta però difficile pensare che la stessa piattaforma analitica e/o lo stesso fornitore siano in grado di garantire elevati livelli qualitativi per tutti i parametri richiesti; la scelta organizzativa, in tal caso, pur rispondendo in maniera adeguata a molte delle prestazioni richieste potrebbe risentire di livelli di qualità non ottimali per un certo numero di analiti. Lo stesso percorso sta riguardando, per altro, le società operanti nel settore della diagnostica, in tal caso, legato alla necessità di poter venire incontro in maniera globale e con soluzioni diversificate alle differenti esigenze nei vari settori del laboratorio (Chimica Clinica, Immunochimica, Ematologia, Coagulazione, Sierologia). Le recenti acquisizioni operate dalla società Siemens (leader sino a quel momento nella diagnostica per immagini, ma assente nella diagnostica di laboratorio) hanno portato a far confluire in una unica struttura (Siemens HealthCare Diagnostics) realtà già ben presenti in moltissimi laboratori ed in particolare nella diagnostica immunometrica automatizzata (Bayer Diagnostics, DPC e Dade Behring) con soluzioni ciascuna caratterizzata da peculiarità interessanti per questa tipologia di analisi. Proprio utilizzando le soluzioni disponibili dai diversi sistemi acquisiti è nato il progetto VersaCell che si pone come obiettivo la disponibilità, per i laboratori di qualsiasi dimensione, di un modello organizzativo in grado di garantire la esecuzione di un elevato numero di parametri senza dover accettare perdite in termini di qualità del risultato per nessuno di questi. Le opzioni possibili consentono di gestire a partire da una unica e compatta unità di campionamento più strumenti (al momento due con possibilità di arrivare a tre sistemi uguali o diversi tra loro) di Chimica Clinica (i sistemi ADVIA) e/o di immunochimica (i sistemi ADVIA Centaur XP ed Immulite XPi).

La preesistente presenza nel nostro laboratorio, per scelta organizzativa non orientato verso percorsi di TLA o di consolidamento tra dosaggi di Chimica Clinica e di Immunochimica, di due dei sistemi coinvolgibili nella soluzione VersaCell ci ha portati ad accettare con interesse la verifica degli impatti organizzativi di tale progetto che ha coinvolto i due strumenti di immunochimica. Nella relazione verranno presentate le nostre esperienze nel confrontare le prestazioni della soluzione precedentemente operativa (in cui ADVIA Centaur e Immulite 2000 lavoravano in maniera indipendente) rispetto alla attuale soluzione in cui gli stessi vengono gestiti, da un unico operatore, tramite una stazione VersaCell come quella riportata nella Figura 1.



Fig. 1 VersaCell Siemens HealthCare: ADVIA Centaur XP e Immulite XPi

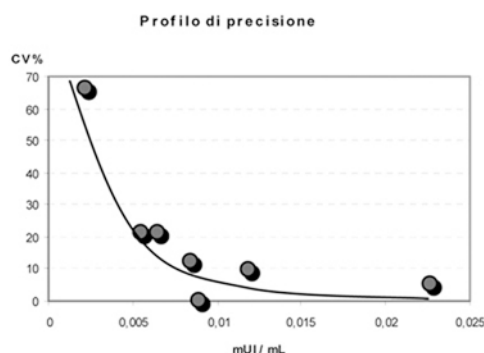
R22

POTENZIALITA' DI UN METODO DI TERZA GENERAZIONE PER LA MISURA DELLA CONCENTRAZIONE EMATICA DEL TSH: VALUTAZIONI ANALITICHE E CLINICHE IN UNO STUDIO MULTICENTRICOM. Caputo¹, A. Fortunato²¹Azienda ULSS 22 Bussolengo, Verona²Presidio Ospedaliero di Vicenza, San Bortolo, Vicenza

Scopo del lavoro: la disponibilità di metodi di terza generazione è comunemente considerata un significativo progresso in tutte le aree diagnostiche che si avvalgono di metodi immunometrici per la determinazione di marcatori di patologia. In campo endocrinologico questo è particolarmente vero per le malattie tiroidee, la cui diagnosi e successivo follow up rimangono saldamente ancorate ad affidabili misure della concentrazione di TSH. Abbiamo voluto studiare le potenzialità di un metodo di recente commercializzazione utilizzando sia una vasta popolazione generale, per verificarne le prestazioni analitiche, che un selezionato gruppo di pazienti neoplastici per ipotizzarne un possibile impiego nella ottimizzazione della terapia soppressiva. Materiali e Metodi: il diagnostico utilizzato è stato il TSH-3 ultra sullo strumento ADVIA Centaur® (Siemens, Tarrytown, USA). La metodologia impiegata ha rispettato lo standard CLSI EP17-A. La sensibilità è stata determinata testando 60 replicati di diluente (LoB = limit of blank) e 20 replicati di 7 campioni con concentrazioni comprese tra 0,002 e 0,023 mUI/L (LoD = limit of detection e LoQ = limit of quantitation). Il metodo è stato confrontato con i reagenti del vecchio kit in uso sulla stessa strumentazione. La popolazione di confronto era costituita da 997 campioni di soggetti reclutati dalla popolazione generale con esclusione di portatori di tireopatie. Per la valutazione clinica sono stati utilizzati i sieri di 400 pazienti tiroidectomizzati per carcinoma papillare della tiroide, sottoposti a svuotamento del comparto centrale e classificati in 4 classi di rischio rispetto alla possibile recidiva in base all'istologia e al TNM.

Risultati: la valutazione della sensibilità ha dimostrato le seguenti concentrazioni: LoB= 0,0006 mUI/L, LoD= 0,003mUI/L e LoQ= 0,007 mUI/L (fissando l'errore totale al 20%). Il confronto con i risultati ottenuti dal metodo precedentemente in uso è rappresentato da una retta di regressione secondo Passing e Bablok con la seguente espressione: $y=0,98x-0,01$ (95% IC: pendenza 0,97-0,99, intercetta -0,03 - +0,0004). Per la valutazione clinica i valori di TSH ottenuti sono stati suddivisi in quartili consentendo di associare i pazienti alle seguenti classi: da 0,006 a 0,015, da 0,015 a 0,043, da 0,044 a 0,132 e da 0,135 a 0,970 mUI/L, con decrescente rischio, in accordo con la stadiazione TMN.

Discussione e Conclusioni: i dati della valutazione analitica hanno confermato che i reagenti del kit TSH-3 ultra possono essere definiti di terza generazione in quanto in possesso di una sensibilità analitica di un intero ordine di grandezza superiore al metodo precedentemente in uso. Sulla scorta di questa evidenza è stato possibile realizzare una classificazione affidabile dei pazienti neoplastici da sottoporre a terapia soppressiva in cui poter dosare la quantità di L- Tiroxina al fine di ottimizzare i benefici e limitare al massimo gli effetti collaterali indesiderati di un sovradosaggio. La disponibilità di un metodo di terza generazione lascia ipotizzare ulteriori significative applicazioni nella diagnosi e nel monitoraggio delle neoplasie tiroidee che, come è noto, rappresentano la più frequente patologia oncologica in Endocrinologia.



R23**IL DECRETO ATTUATIVO DELLA NORMATIVA SULLA GESTIONE DELLE MANSIONI A RISCHIO**R. Pacifici¹¹*Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Con l'entrata in vigore del provvedimento relativo alle procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni a rischio, sono state individuate le procedure operative (diagnostiche e medico legali) cui devono allinearsi le imprese, le Aziende Sanitarie Locali, le Aziende Ospedaliere e i medici competenti, coinvolti nel sopracitato provvedimento. Tali procedure saranno analizzate in dettaglio con l'obiettivo di consentirne l'applicazione puntuale ed uniforme da parte del personale interessato. Saranno altresì messi in luce e commentati alcuni punti-chiave della legge, quali ad esempio quelli relativi ai valori soglia (cut-off) da utilizzare nei test di screening e nei test di conferma, o quelli relativi ai metaboliti urinari delle principali droghe d'abuso da identificare nei test di conferma ed infine eventuali possibilità di adulterazione dei campioni, con particolare attenzione alle eventuali differenze applicative nelle diverse Regioni d'Italia.

R24

METODI IMMUNOCHEMICI RAPIDI (ON SITE) PER LO SCREENING TOSSICOLOGICO DELLE URINE

M. Filocamo¹

¹Medicina di Laboratorio Ospedale Infermi AUSL Rimini

La diffusione del consumo di sostanze stupefacenti e psicotrope, rappresenta uno dei fenomeni più preoccupanti del nostro tempo. Negli ultimi anni sono state realizzate numerose campagne di informazione e prevenzione, che non hanno contribuito in modo significativo ad arginare il fenomeno. Le esigenze del mercato e la legislazione (Conferenza unificata stato regione del 30 ottobre 2007: accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza e di assunzione sostanze stupefacenti e psicotrope nei lavoratori), hanno fatto registrare un progressivo interesse da parte dell'industria dei diagnostici, rivolto a migliorare la performance dei test rapidi per la rilevazione di droghe. E' disponibile sul mercato un'ampia gamma di dispositivi on site a seconda delle esigenze, dal test singolo a test multipli, in forma di card o cassetta, stick ad immersione o coppetta. Alcune linee hanno una striscia termometrica per verificare l'idonea temperatura del campione e il dosaggio della creatinuria come test anti adulterazione. Utilizzano diverse matrici: urina, saliva, sangue, sudore. Le tecniche utilizzate per questo tipo di analisi di screening sono essenzialmente due: il metodo immunocromatografico basato sul principio del legame competitivo e il metodo immunofluorimetrico con l'impiego di anticorpi monoclonali specifici. I test rapidi attualmente presenti sul mercato hanno livelli di sensibilità e specificità paragonabili a quelli dei metodi immunochimici utilizzati in laboratorio per lo screening di sostanze illecite; presentano l'indubbio vantaggio di poter essere utilizzati in ogni luogo e di essere rapidi ma è necessario tenere presente che possono dare risultati "falsi positivi" in quanto gli anticorpi impiegati possono mostrare affinità anche per sostanze con struttura simile a quella dell'antigene; i risultati "presumibilmente positivi" necessitano di test di conferma in grado di identificare le singole sostanze e i loro metaboliti. A tale scopo devono perciò essere utilizzate tecniche basate sulla spettrometria di massa abbinate a tecniche separative cromatografiche. Per fornire un risultato affidabile e certo, la sola tecnologia non è sufficiente, l'interpretazione del risultato non può basarsi solo sulla lettura del test, ma sono indispensabili nozioni di farmacocinetica e conoscenze sul metabolismo delle singole sostanze d'abuso. Il responso Positivo o Negativo deve essere rapportato ed illustrato alla luce di considerazioni e conoscenze precise circa le potenzialità e i limiti del metodo utilizzato al fine di evitare interpretazioni fuorvianti.

E' evidente che l'utilizzo dei "drug test", può essere considerato una grande risorsa in grado di fornire dati analitici utili ed affidabili se vengono rispettati alcuni parametri, ovvero: una corretta procedura di campionamento, la conferma cromatografica accoppiata a spettrometria di massa di tutti i risultati positivi, l'esecuzione dei test e la valutazione dei risultati da parte di professionisti competenti.

R25
L'ADULTERAZIONE DEL CAMPIONE NEGLI ACCERTAMENTI TOSSICOLOGICI

G. Dall'Olio¹

¹*Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "S. Bortolo", Vicenza*

E' noto che un numero sempre maggiore di soggetti che assumono sostanze stupefacenti mette in atto strategie di adulterazione e sostituzione dei campioni biologici da inviare al laboratorio per gli accertamenti tossicologici, al fine di invalidarne i risultati.

Viene presa in considerazione la problematica della manomissione dei campioni di urina e di capello, esaminando i metodi e le sostanze più utilizzate per l'adulterazione ed il loro meccanismo di azione, dai comuni detergenti e composti chimici di uso domestico ai prodotti appositamente studiati allo scopo, reperibili tramite Internet.

Vengono anche riportati i sistemi a disposizione dei laboratori per contrastare il fenomeno, dal corretto campionamento, alla misura di alcuni parametri fisici e chimici, eseguiti anche con semplici test a strisce, che permettono di individuare le sostanze adulteranti, eventuali diluizioni o sostituzioni dell'urina e arrivare così a stabilire l'idoneità del campione all'analisi tossicologica.