

tema, sono stati descritti casi di atleti dediti a sport estremo e con cuore perfettamente sano in cui sono stati trovati valori di troponina aumentati; tali positività potrebbero corrispondere a piccole lesioni miocardiche che si presentano solo in una bassa percentuale di atleti. Il significato di queste lesioni resta da definire; tuttavia va sottolineato che il danno appare transitorio e non limitante la funzionalità cardiaca; infatti, tutti gli atleti hanno potuto continuare l'attività agonistica. Rimane comunque aperta la questione dell'effetto sommatorio di tali microlesioni.

Sempre su questo tema, Daniela Cardinale (Milano) ha riportato i risultati di uno studio riguardante il dosaggio della cTnI nella valutazione del danno cardiaco indotto da chemioterapia ad alte dosi. Lo scopo è stato quello di valutare il rischio a breve e a lungo termine dei pazienti oncologici sottoposti a tale trattamento. I dati presentati hanno mostrato come l'innalzamento della cTnI in questi pazienti sia correlato ad un aumentato rischio di sviluppo di disfunzione ventricolare sinistra: il danno cardiotossico risultava cumulativo e dose-dipendente, ma indipendente dal cocktail farmacologico utilizzato. Gli aumenti di cTnI, spesso di lieve entità, indicavano un danno miocardico "minore", tuttavia correlato con il successivo grado di riduzione della frazione di eiezione ventricolare e, pertanto, consentivano di individuare i pazienti a rischio di sviluppare un deficit funzionale cardiaco e di predire l'entità della disfunzione stessa. L'innalzamento della cTnI, che precede la riduzione della performance cardiaca, potrebbe anche consentire di prendere per tempo le opportune misure per evitarla o almeno ridurla.

Franca Pagani (Brescia) ha parlato di una molecola ancora poco nota, la "Heart Fatty Acid-Binding Protein" (h-FABP) e del suo impiego come possibile marcatore precoce di danno del miocardio. Pochi sono i lavori su tale argomento; tuttavia i risultati sono indicativi di una buona sensibilità nelle prime ore dall'esordio della sintomatologia. Un recente confronto ha indicato una sensibilità di 81% per h-FABP e di 57% per la mioglobina nelle prime 3 ore dall'inizio della sintomatologia dolorosa; inoltre, mentre la mioglobina in caso di IMA aumenta mediamente di circa 4 volte, l'h-FABP aumenta di 20 volte rispetto alla norma. Per questo test non sono ancora stati definiti i cutoff decisionali per cui alcuni lavori riportano risultati discordanti. Tuttavia, è sicuramente un test molto promettente e probabilmente troverà spazio nel futuro per la sua spiccata precocità.

La penultima relazione è stata tenuta da G. Cattozzo (Varese) che ha riportato i risultati di una sperimentazione multicentrica su strumenti Roche Elecsys dei metodi per la determinazione della mioglobina, CK-MB e cTnT. Sono state studiate la precisione (in confronto con il goal analitico) e la linearità ed è stato eseguito il confronto con altri metodi del commercio. Sono state messe in evidenza, tra l'altro, le significative differenze che si riscontrano su campioni diversi (siero/plasma eparinato) per quel che riguarda il

dosaggio della cTnT. Come commentato da Panteghini, tale sperimentazione può essere additata come esempio di proficua collaborazione tra le aziende del settore e gli utilizzatori per la messa a punto e la valutazione di nuovi metodi.

S. Petrini (Milano) ha infine descritto una strategia per lo studio ed il miglioramento degli "outcomes" sanitari. Il modello studiato per la diagnosi di IMA ha preso in considerazione l'analisi dei processi sanitari coinvolti nei percorsi clinici, l'individuazione delle risorse coinvolte e la loro valorizzazione. In questa fase preliminare dell'esperienza sono stati riportati i risultati ottenuti su 43 pazienti con sospetto IMA; la fase successiva permetterà l'applicazione del modello ad una popolazione numericamente più significativa consentendo di giungere a conclusioni più definitive sulla validità del sistema stesso.

G. V. Melzi d'Eril

Cattedra di Biochimica Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università degli Studi dell'Insubria, Varese

Bibliografia

1. Pergolini P. III edizione Corso CEFAR "Il laboratorio nella diagnostica cardiologica". Med Lab 1997;5:87-8.
2. Pergolini P. IV edizione Corso CEFAR "Il laboratorio nella diagnostica cardiologica". Med Lab 1998;6:229-32.
3. Bonetti G. Quinta edizione corso CEFAR "Il laboratorio nella diagnostica cardiologica". Med Lab 1999;7:97-102.
4. Pagani F. VI^a edizione corso CEFAR "Il laboratorio nella diagnostica cardiologica". Riv Med Lab 2000;1:in stampa.
5. Panteghini M, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Wu AHB. Use of biochemical markers in acute coronary syndromes. IFCC Scientific Division, Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage. Clin Chem Lab Med 1999;37:687-93.

Marcatori di lesione miocardica: panorama della letteratura relativo al secondo trimestre 2000

Nella letteratura recente relativa ai marcatori biochimici di danno miocardico vengono messe in rilievo, anche per merito di una recente rassegna di Mauro Panteghini, alcune problematiche relative alla loro determinazione, sia riguardanti la fase preanalitica che quella più propriamente analitica. Tra queste vi sono le possibili interferenze dovute alla presenza di anticorpi cosiddetti "eterofili" e quelle nell'utilizzo di campioni di plasma al posto del siero con l'intento di ridurre il "turnaround time" (TAT) dell'esame.

E' noto da tempo come gli anticorpi eterofili, gli autoanticorpi e lo stesso fattore reumatoide possano

essere potenziale causa di interferenza, sia positiva che negativa, con i più comuni immunodosaggi di tipo "sandwich". E' quindi necessario che questa possibile interferenza venga presa in considerazione anche nella scelta e nell'implementazione degli immunodosaggi delle proteine cardiache. Dasgupta e collaboratori hanno recentemente descritto la possibilità di ottenere risultati falsi positivi nella determinazione della troponina I cardiaca (cTnI) impiegando il "microparticle enzyme immunoassay" (MEIA) su analizzatore Abbott AxSYM. 7 pazienti su 12 con fattore reumatoide aumentato, ma senza infarto miocardico acuto (IMA), presentavano valori misurabili di cTnI e 4 di questi mostravano incrementi superiori al cutoff decisionale per la diagnosi di IMA. Gli stessi pazienti non presentavano invece concentrazioni misurabili di troponina T cardiaca (cTnT), determinata con analizzatore Roche Elecsys, e di cTnI, determinata mediante un metodo alternativo su analizzatore Bayer ACS:180. L'interferenza da fattore reumatoide poteva essere eliminata mediante l'impiego preliminare di un antisiero policlonale diretto verso il fattore reumatoide stesso con il quale trattare i sieri con concentrazioni elevate di questa immunoglobulina. In un altro studio condotto da un gruppo canadese su pazienti in dialisi peritoneale, emodialisi, con insufficienza renale e con elevati valori di creatinina (>300 U/L) è stato dimostrato che su 239 campioni analizzati, 10 superavano il cutoff per l'IMA senza presentare alcuna evidenza di necrosi acuta del miocardio, configurandosi quindi come falsi positivi. Impiegando per la determinazione della cTnI sia il sistema Bayer Immuno 1 che quello Abbott AxSYM era visto che 8 pazienti dei 10 positivi mostravano risultati discordanti e che AxSYM dava risultati falsi positivi in numero maggiore rispetto ad Immuno 1. L'unico campione falso positivo per l'Immuno 1 era visibilmente lipemico.

Al fine di limitare l'interferenza da anticorpi eterofili e, più in generale, da anticorpi anti-animale, Abbott ha recentemente modificato la formulazione del MEIA per la cTnI su AxSYM. In una lettera pubblicata su *Clinical Chemistry* vengono confrontati gli immunodosaggi per la determinazione di cTnI su Beckman Access e su AxSYM nelle due formulazioni. Su 23 pazienti con fattore reumatoide aumentato, 22 non presentavano una concentrazione determinabile di cTnI su Access contro un unico individuo su AxSYM 1^a generazione. L'impiego preliminare di un sistema bloccante gli anticorpi eterofili non modificava i valori di cTnI su Access, mentre cambiava il comportamento della cTnI su AxSYM. Usando la 2^a generazione del test AxSYM 17 dei 19 sieri risultati positivi con la 1^a generazione risultavano negativi. Secondo gli autori, i due rimanenti risultati positivi ottenuti con la 2^a generazione del test erano da imputare ad un'interferenza di tipo non anticorpale. Anche in un altro lavoro pubblicato su *Clinica Chimica Acta* si conferma come la nuova versione di reagente per la cTnI su AxSYM conduca ad

una notevole riduzione dei falsi positivi dovuti alla presenza degli anticorpi eterofili.

Se il meccanismo di interferenza anticorpale umana anti-topo è ben conosciuto, poco si conosce riguardo alla durata di tale interferenza e alla diversa suscettibilità delle procedure di immunodosaggio delle proteine cardiache. In un lavoro pubblicato su *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* è stato evidenziato come l'effetto di tali anticorpi sugli immunodosaggi possa essere transitorio. Lo studio si è basato sull'analisi di campioni ripetuti di due pazienti, nei quali fu notato un innalzamento di CK-MB a 8 giorni di distanza da interventi chirurgici. In particolare, in un paziente fu notato un aumento permanente di CK-MB determinata su Immuno 1, associato ad un transitorio incremento di CK-MB determinata su Elecsys, mentre nessun aumento era notato se la CK-MB era determinata su AxSYM. Questi falsi aumenti di CK-MB erano associati a saltuari aumenti di cTnT su Elecsys e di cTnI su Immuno 1 non confermati in prelievi ripetuti successivamente. Nel secondo paziente si ebbero aumenti falso-positivi di CK-MB determinata su Immuno 1, ma non su AxSYM ed Elecsys e nessun incremento di cTnT e cTnI misurate su Elecsys e Immuno 1. La preincubazione dei campioni di entrambi i pazienti con siero di topo non immune, seguito dalla rianalisi dei campioni per CK-MB, cTnI e cTnT eliminava l'interferenza positiva, confermando quindi un problema nel dosaggio dovuto ad anticorpi eterofili. L'interesse di tale studio è quello di aver evidenziato come l'interferenza da eterofili sia molto variabile tra le diverse procedure di immunodosaggio delle varie ditte produttrici. Importante è pure il riscontro della scomparsa di tale interferenza dopo un numero variabile di giorni, quando i pazienti venivano monitorati nel tempo.

In conclusione, sebbene la maggior parte dei produttori di immunodosaggi tipo "sandwich" includa nella preparazione dei propri reagenti degli agenti bloccanti come immunoglobuline di topo per neutralizzare l'effetto degli anticorpi eterofili, va tuttavia sottolineato come alcuni pazienti possano ugualmente mostrare un'interferenza se la concentrazione anticorpale eccede la capacità neutralizzante dei reagenti o se l'antigenicità dell'agente bloccante non associa la specificità dell'anticorpo presente nel siero dei pazienti. Secondo le raccomandazioni dei vari Comitati e Gruppi di Studio nazionali e internazionali, la determinazione dei marcatori biochimici di danno miocardico dovrebbe essere possibile con un TAT massimo di un'ora. Per ridurre il TAT è utile l'impiego, in sostituzione al siero, di campioni di plasma che non necessitano di attendere la formazione del coagulo prima della centrifugazione. Sul fascicolo di *Clinical Chemistry* del giugno 2000 sono stati pubblicati i risultati di uno studio sull'impiego di campioni eparinati nella determinazione della cTnT (metodo Elecsys 3^a generazione) e della cTnI (metodo DPC Immulite). In tale studio è emerso come il campione eparinato mostrasse una concentrazione di cTnT in media infe-

riore del 15% a quella del siero, e la cTnI Immulite pure soffrì di una significativa interferenza. Eseguendo un'esperimento di titolazione, era inoltre notata una progressiva inibizione della concentrazione di cTnT all'aumentare della concentrazione di eparina. Ancora, per una data concentrazione di eparina esisteva una notevole variabilità nello scostamento tra i diversi campioni. Era notata una maggior riduzione percentuale (~30%) nei campioni in cui si associavano elevate concentrazioni di cTnT, mioglobina e CK-MB, pattern tipico della prima fase dopo il danno miocardico; la riduzione era invece minore (5-10%) nei campioni con la sola cTnT aumentata, quadro tipico delle fasi tardive. Lo stesso comportamento si aveva per la cTnI. Quindi l'eparina, usata come anticoagulante, riduce significativamente la concentrazione di cTnT e cTnI, probabilmente mediante un legame alle tropnine stesse con conseguente riduzione della loro immunoreattività; l'entità di tale riduzione può dipen-

derne risultati per questo metodo assolutamente sovrapponibili a quelli del siero. Per la determinazione della CK-MB nessuno dei due tipi di plasma risultava idoneo, con uno scostamento positivo del 15-18%. Infine, per la determinazione della mioglobina poteva essere usata eparina ma non EDTA. Relativamente a questo lavoro, è curioso rilevare che Bayer riporta nella pubblicazione relativa al metodo un bias negativo significativo, pari a circa -17%, nella determinazione di cTnI su plasma eparinato, per cui gli autori ipotizzano che tale differenza possa essere imputata ai diversi tipi di provette o di eparina impiegati nelle diverse sperimentazioni.

In conclusione, sebbene sia indubbio che per l'analisi dei marcatori cardiaci con immunodosaggi automatizzati l'uso di campioni di plasma anziché di siero possa essere molto utile perché elimina il tempo necessario per la coagulazione, riducendo quindi i tempi preanalitici totali, può esserci una significativa diffe-

Tabella I. Sinopsi relativa al possibile impiego dei due principali tipi di anticoagulante per la determinazione della mioglobina e delle troponine cardiache su alcune strumentazioni automatiche disponibili commercialmente

Ditta/Strumento	Tipo di campione	
	Plasma eparinato	Plasma EDTA
Bayer ACS:180	Utilizzabile	Utilizzabile per mioglobina
Beckman Access	Non utilizzabile*	Utilizzabile per troponina I
Dade Stratus II	Utilizzabile per troponina I	Utilizzabile per mioglobina
Roche Elecsys	Utilizzabile per mioglobina	Utilizzabile per troponina T

**"Non utilizzabile" indica una differenza media $\geq 6\%$ tra i valori ottenuti nel plasma con l'anticoagulante considerato e quelli ottenuti impiegando il siero in un prelievo contemporaneo.

dere dalla presenza delle diverse forme di troponina (libera o complessata) presenti in circolo e dagli anticorpi impiegati nei diversi immunodosaggi. A questo proposito deve essere notato il carattere fuorviante del titolo di tale lavoro, dove non si accenna minimamente alla metodo-dipendenza dell'interferenza per la cTnI, attribuendo il problema in termini generalizzati a tutti i test che la dosano (un'occasione persa dagli autori per dimostrare una maggiore obiettività scientifica, visto anche lo stretto legame di alcuni di essi con la ditta produttrice del kit per la cTnT, ma persa anche dai revisori secondo un limite peraltro già evidenziato e denunciato in questa rubrica).¹

La metodo-dipendenza dell'interferenza da eparina sulla cTnI risalta molto bene da una lettera pubblicata contemporaneamente sulla stessa rivista, nella quale è presentato uno studio sull'impiego di campioni di plasma eparinato e EDTA nella determinazione dei tre marcatori biochimici di danno miocardico, mioglobina, cTnI e CK-MB, su analizzatore Bayer ACS:180. Usando l'EDTA tripotassico era individuata per la cTnI una differenza statisticamente significativa rispetto ai risultati ottenuti con il siero, con uno scostamento medio di +30%, mentre l'impiego di eparina

Di conseguenza, il tipo di anticoagulante da impiegare dovrebbe essere chiaramente validato dal produttore prima di suggerirne l'uso nella pratica clinica. In generale, si dimostra comunque come sia ancora complessivamente difficile utilizzare nella pratica routinaria della determinazione dei marcatori cardiaci campioni alternativi al siero, anche su strumentazioni di recente introduzione. La speranza è che sulla scorta delle raccomandazioni preparate da organismi nazionali ed internazionali sull'impiego di plasma (o sangue intero) al posto del siero, l'industria diagnostica sviluppi proposte capaci di bypassare le problematiche fin qui evidenziate.

G. Bonetti

*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1,
Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia*

Bibliografia

1. Dolci A, Panteghini M. Marcatori di lesione miocardica: commento alla letteratura pubblicata nel primo trimestre 2000. Riv Med Lab 2000;1:in stampa.

Pubblicazioni recensite:

- Panteghini M. **Present issues in the determination of troponins and other markers of cardiac damage.** Clin Biochem 2000;33:161-6.
- Dasgupta A, Banerjee SK, Datta P. **False-positive troponin I in the MEIA due to the presence of rheumatoid factors in serum.** Am J Clin Pathol 1999;112:753-6.
- Parry DM, Krahn J, Leroux M, Dalton J. **False positive analytical interference of cardiac troponin I assays: an important consideration for method selection.** Clin Biochem 1999;32:667-9.
- Onuska KD, Hill SA. **Effect of rheumatoid factor on cardiac troponin I measurement using two commercial measurement systems.** Clin Chem 2000;46:307-8.
- Yeo KTJ, Storm CA, Li Y, Jayne JE, Brough T Quinn-Hall KS, Fitzmaurice TF. **Performance of the enhanced Abbott AxSYM cardiac troponin I reagent in patients with heterophilic antibodies.** Clin Chim Acta 2000;292:13-23.
- Kazmierczak SC, Catrou PG, Briley KP. **Transient nature of interference effects from heterophile antibodies: examples of interference with cardiac marker measurements.** Clin Chem Lab Med 2000;38:33-9.
- Gerhardt W, Nordin G, Herbert AK, Burzell BL, Isaksson A, Gustavsson E, et al. **Troponin T and I assays show decreased concentrations in heparin plasma compared with serum: lower recoveries in early than in late phases of myocardial injury.** Clin Chem 2000;46:817-21.
- Pagani F, Bonetti G, Stefani F, Cuccia C, Panteghini M. **Serum and plasma samples for ACS:Systems cardiac markers.** Clin Chem 2000;46:1020-2.
- Oh SK, Foster K, Datta P, Orswell M, Tasaico K, Mai X, et al. **Use of a dual monoclonal solid phase and a polyclonal detector to create an immunoassay for the detection of human cardiac troponin I.** Clin Biochem 2000;33:255-62.

Nota: Chi fosse interessato alla visione integrale delle pubblicazioni recensite, può farne richiesta al seguente numero di fax: 030 3995369 (Dr.ssa Graziella Bonetti).

Studio multicentrico interdisciplinare sugli autoanticorpi nelle connettiviti

Nell'ambito del XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Reumatologia tenutosi a Milano dal 15 al 18 novembre 2000, sono stati presentati i risultati di uno studio multicentrico effettuato dal gruppo di lavoro FIRMA (Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni) che raggruppa i maggiori esperti italiani nella diagnostica autoanticorpale e di cui fanno parte membri delle società scientifiche di Reumatologia, Immunologia Clinica, Dermatologia, Medicina Interna, Nefrologia e, per la Medicina di Laboratorio, il gruppo di studio in autoimmunologia della SIMeL.

Nella prima parte della sessione intitolata "Gli autoanticorpi tra la clinica e il laboratorio: verifica interdisciplinare della riproducibilità dei test diagnostici e proposta di elaborazione di linee guida", presieduta dal prof. Roberto Marcolongo di Siena e dal dott.

Renato Tozzoli di Latisana, la dr.ssa Gabriella Morozzi di Siena ha presentato i risultati dello studio relativo agli anticorpi anti-nucleo e anti-dsDNA, sottolineando come, benchè i test siano stati eseguiti da laboratori di riferimento e di comprovata affidabilità, si sia comunque riscontrata una bassa riproducibilità interlaboratorio, con un 7% di falsi negativi per gli ANA e un 15% di falsi positivi per gli anti-dsDNA.

Successivamente, il dott. Nicola Bizzaro di San Donà di Piave ha discusso i dati relativi alla affidabilità diagnostica dei metodi per la determinazione degli autoanticorpi anti-ENA, evidenziando che i metodi impiegati (ELISA, IB, WB DB e ID) sono risultati complessivamente dotati di buona sensibilità (91%) e di ottima specificità (99%) e che il solo metodo di controimmuno-elettroforesi è risultato scarsamente sensibile (78%). Questi dati, che confermano quelli ottenuti in analoghi studi condotti tra i Laboratori italiani con metodi commerciali, sono particolarmente importanti perché ottenuti in ambito multidisciplinare, utilizzando metodi sia commerciali che *home made*. Questa prima indagine conoscitiva sulla situazione esistente in Italia per quanto riguarda la diagnostica autoanticorpale, costituisce la base di partenza per un ulteriore processo di standardizzazione allargato ai laboratori delle cliniche universitarie.

La dott.ssa Angela Tincani di Brescia presentando i risultati relativi agli anticorpi anti-cardiolipina (aCL) e agli ANCA, ha sottolineato la notevole variabilità che è stata riscontrata nel dosaggio quantitativo degli aCL ed ha suggerito che probabilmente sarebbe più utile se l'espressione dei risultati degli aCL fosse fatta in termini di range di positività (basso, medio, alto). Certamente, per questo test, la mancanza di linee guida per la esecuzione del test e per il calcolo dei risultati e la mancanza di standard internazionali, non giova alla riproducibilità dei risultati. Benchè teoricamente meglio codificata, anche la esecuzione della metodica in immunofluorescenza indiretta (IFI) per gli ANCA risulta ancora scarsamente riproducibile e vista l'importanza del test, la dott.ssa Tincani ha consigliato di seguire le linee guida internazionali che raccomandano l'esecuzione simultanea su tutti i campioni del test IFI e dei due classici test ELISA per PR3 e MPO.

Nella seconda parte dell'incontro sono state presentate le proposte di linee guida per la determinazione degli anticorpi anti-nucleo (prof. Pier Luigi Meroni di Milano) e per la determinazione e la refertazione degli ANCA (dott. Alberto Sinico di Milano), che hanno suscitato una lunga e approfondita discussione.

Nonostante la sessione abbia avuto luogo il sabato pomeriggio dopo tre intense giornate di attività congressuale, vi hanno partecipato oltre 400 persone, a dimostrazione dell'enorme interesse che la diagnostica di Laboratorio delle malattie reumatiche riveste anche tra i colleghi clinici.

Nicola Bizzaro

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