

## ARTICOLO ORIGINALE

# Il problema dei falsi positivi e falsi negativi di troponina. Parte I: revisione critica della letteratura

## The issue of false positive and false negative results of troponin. Part I. Critical review of the literature

Francesca VENEZIANI <sup>1</sup> \*, Massimiliano MANNO <sup>2</sup>, Elisabetta STENNER <sup>3</sup>, Marco MORETTI <sup>4</sup>, Margherita MORANDINI <sup>5</sup>, Gianni A. GALLI <sup>6</sup>, Maria A. BURGIO <sup>7</sup>, Lucia MALLOGGI <sup>8</sup>, Giulio MARINO <sup>9</sup>, Dina DI MARIA <sup>10</sup>, Deborah MAZZEI <sup>8</sup>, Daniela RUBIN <sup>11</sup>, Matteo CASSIN <sup>12</sup>, Alessio GAMBONI <sup>13</sup>, Piero CAPPELLETTI <sup>14</sup>, a nome del Gruppo di Studio sui Marcatori Miocardici (GdS MM) della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL)

<sup>1</sup>SOS Laboratorio Analisi, Ospedale S. Maria Nuova, USL Centro Toscana, Firenze, Italia; <sup>2</sup>Laboratorio Analisi, Città di Lecce Hospital-GVM Care&Research, Lecce, Italia; <sup>3</sup>Struttura Complessa di Patologia Clinica, ASUITS, Trieste, Italia; <sup>4</sup>Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti, Ancona, Italia; <sup>5</sup>Struttura Complessa Laboratorio Analisi, AAS5, Pordenone, Italia; <sup>6</sup>Estote Misericordes, Firenze, Italia; <sup>7</sup>Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedale Barone Lombardo, Canicattì, Agrigento, Italia; <sup>8</sup>Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliero Universitaria di Pisa, Pisa, Italia; <sup>9</sup>Laboratorio Analisi, AUSL Bologna, Vergato, Bologna, Italia; <sup>10</sup>Laboratorio Analisi Polimedica, Ravanusa, Agrigento, Italia; <sup>11</sup>Laboratorio Analisi AULSS2, Conegliano Veneto, Treviso, Italia; <sup>12</sup>Dipartimento di Cardiologia, Casa di Cura San Giorgio, Pordenone, Italia; <sup>13</sup>Unità di Medicina d'Urgenza, ASL2 Foligno, Perugia, Italia; <sup>14</sup>SIPMeL, Castelfranco Veneto, Treviso, Italia

\*Autore di contatto: Francesca Veneziani, Laboratorio Analisi Ospedale S. Maria Nuova, piazza S. Maria Nuova 1, 50122 Firenze, Italia. E-mail: [francesca.veneziani@uslcentro.toscana.it](mailto:francesca.veneziani@uslcentro.toscana.it)

### RIASSUNTO

**Premesse:** Il tema dei risultati falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN) di troponina (cTn) è un problema emergente anche nell'era della troponina ad alta sensibilità (hs-cTn). Abbiamo voluto verificare con una revisione critica quasi-sistematica della letteratura il livello di conoscenza sulle interferenze nei metodi di cTn (specificità analitica), in particolare nell'epoca della hs-cTn, e la disponibilità di suggerimenti per opportune misure di contenimento e risoluzione del problema.

**Metodi:** Sono state eseguite ricerche su PubMed con i termini "false positive", "false negative", "troponin", "cTn" e i risultati sono stati esaminati per identificare i lavori attinenti all'aspecificità analitica e quelli utili a fornire indicazioni per una classificazione delle interferenze analitiche e suggerire criteri per la prevenzione e la risoluzione del problema dei FP/FN di cTn.

**Risultati:** Le ricerche hanno fornito 106 lavori su 279 totali riguardanti le interferenze analitiche dal 1991 ad oggi, di cui 46 negli ultimi 5 anni che hanno visto la diffusione delle troponine ad alta sensibilità (hs-cTn). Sulla base delle revisioni non sistematiche disponibili e della selezione di lavori significativi è stato redatto un elenco ragionato delle possibili cause di FP/FN di cTn, distinguendo cause preanalitiche legate al paziente e al prelievo e cause strettamente analitiche legate allo strumento, al metodo, all'analita e al campione.

**Conclusioni:** In letteratura esistono diverse segnalazioni di FP/FN analitici di cTn e hs-cTn e alcune revisioni non sistematiche. Tuttavia, mancano raccomandazioni di buona pratica standardizzate, esaustive e utilizzabili nel laboratorio quotidiano.

(Per citare questo articolo: Veneziani F, Manno M, Stenner E, Moretti M, Morandini M, Galli GA, *et al.*; Gruppo di Studio sui Marcatori Miocardici (GdS MM) della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL). Il problema dei falsi positivi e falsi negativi di troponina. Parte I: revisione critica della letteratura. Riv Ital Med Lab 2019;15:132-9 .DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00016-1)

**Parole chiave:** Troponina; Falsi positivi; Falsi negativi.

## ABSTRACT

**Background:** The issue of false positive (FP) and false negative (FN) results of troponin (cTn) continues also in the era of high sensitivity troponin (hs-cTn). The aim of the present work was a critical review of literature to understand the level of awareness of the issue of analytical interferences of cTn methods and the availability of indications for the prevention and the solution of the problem.

**Methods:** Researches were conducted on PubMed with the terms “false positive”, “false negative”, “troponin”, “cTn” for identifying specific literature on analytical interferences of cTn methods, and for a useful classification of FP/FN and recommendations for their prevention and solution.

**Results:** One hundred and six articles from 279 selected by PubMed focused on analytical interferences of cTn, 46 in the last five years *i.e.* in the hs-cTn era. From reviews of literature and some selected articles, a reasoned list of causes of FP/FN of cTn was defined, considering preanalytical (patient and phlebotomy) and the analytical (instrument, method, analyte, sample) phases.

**Conclusions:** In the scientific literature several articles and some reviews exist about FP/FN of cTn. Nevertheless, in our opinion, robust and exhaustive recommendations for the everyday laboratory practice are still lacking.

**Key words:** Troponin; False positive reactions; False negative reactions.

## Introduzione

La letteratura scientifica dedica spazio al tema dei falsi positivi (FP) e dei falsi negativi (FN) di troponina (cTn) anche nell'era della troponina ad alta sensibilità (hs-cTn). Tuttavia questi termini vengono usati indifferente in relazione alla specificità tessutale (sono le cTn cardio-specifiche?),<sup>1, 2</sup> alla specificità clinica (la cTn individua i pazienti sani rispetto alla patologia cardiaca di etiologia ischemica?),<sup>3, 4</sup> o alla specificità analitica del biomarcatore (i metodi di cTn sono interferiti?)<sup>5, 6</sup> e tale confusione non aiuta una chiara visione del problema ed una armonizzazione dei metodi per prevenirlo e minimizzarlo.

Abbiamo, pertanto, voluto verificare con una revisione critica quasi-sistematica della letteratura scientifica disponibile il livello di conoscenza della tematica delle interferenze sui metodi di cTn (specificità analitica), in particolare nell'era della hs-cTn, e la disponibilità di suggerimenti ed indicazioni per opportune misure di contenimento e risoluzione del problema nel laboratorio clinico di tutti i giorni.

## Materiali e metodi

Sono state eseguite ricerche su PubMed con i termini “false positive”, “false negative”, “troponin”, “cTn”, “hs-cTn” con il limite “human”, dall'introduzione del test nella pratica clinica alla fine negli anni novanta del secolo

scorso e, in particolare, nell'ultimo quinquennio caratterizzato dall'introduzione della hs-cTn.

Sono stati eliminati i lavori che comparivano in più di una ricerca. Successivamente, tra i risultati delle ricerche sono stati selezionati i lavori attinenti all'aspecificità analitica. Questi lavori riguardanti le interferenze analitiche, integrati da conoscenze dirette, sono stati esaminati per identificare quelli utili a fornire indicazioni per una classificazione delle interferenze analitiche e suggerire criteri per la prevenzione e la risoluzione del problema dei FP/FN di cTn.

## Risultati

Le ricerche generali su PubMed ha fornito 106 lavori, su 279 totali, riguardanti le interferenze analitiche dal 1991 ad oggi. Quella ristretta agli ultimi 5 anni, che hanno visto la diffusione delle troponine ad alta sensibilità (hs-cTn), ha prodotto 46 riferimenti bibliografici utili.

Tra questi quarantasei lavori, il 37% riguarda la cosiddetta aspecificità clinica, 11% la aspecificità tissutale, 43% la aspecificità analitica comprendente interferenze preanalitiche legate al paziente (da biotina,<sup>7-9</sup> fosfatasi alcalina (ALP),<sup>10, 11</sup> anticorpi monoclonali,<sup>12, 13</sup> trasfusione<sup>14</sup>) o al prelievo (da matrice<sup>15</sup>) e di interferenze analitiche legate al campione (da anticorpi eterofili (HA),<sup>16-23</sup> fattore reumatoide,<sup>12</sup> macrotroponina<sup>24</sup>) o al metodo/strumento (effetto

TABELLA I.—Schema delle interferenze FP/FN di cTn.

	Fasi TTP	Interferenza FP	f+	Interferenza FN	f+
Preanalitiche Paziente	Biotina			+	Raro
	Digiuno/Lipemia Iperfosfatemia	FPIA, Beckman	Raro	+	Raro
Prelievo	Ittero Emolisi <i>in vivo</i>			+	Raro
	Emolisi <i>in vitro</i>	cTnI Abbott e ORTHO	3%	cTnT; cTnI LOCI	3%
	Fibrina	+/-	2,2%	+/-	2,2%
	Materiali	*		*	
	Matrice	+		+	
Analitiche Strumento Metodo Analita Campione		+	Raro	+	Raro
		+/-	Raro	+/-	Raro
		*		*	
	HA/HAMA Fattore reumatoide Macrotrponina Autoanticorpi anti-cTn	+ + cTnI Abbott	3,1% 1% 5%	+/-	Raro  cTnI 10%

f+: frequenza; TTP: Total Testing process; \*dati non rilevabili.

gancio,<sup>21</sup> *carry-over*,<sup>25</sup> *outliers*<sup>26</sup>). 11% sono revisioni non sistematiche del problema.<sup>5, 6, 27-29</sup>

Sulla base delle revisioni di letteratura e di alcuni articoli selezionati, anche per conoscenza diretta da parte degli Autori, è stato possibile stilare un elenco ragionato delle cause di FP/FN di cTn, seguendo uno schema modificato da Herman *et al.*,<sup>5</sup> che viene presentato di seguito e, sinteticamente, in Tabella I.

### Cause pre-analitiche di FP e FN di troponina

#### Paziente

- Biotina (vitamina B7 per gli autori anglosassoni e B8 per gli autori francesi). La dose terapeutica può arrivare a 100-300 mg per giorno in alcune malattie specifiche come la sclerosi multipla (MS) con una concentrazione ematica di biotina circolante fino a 1200 ng/ml. La biotina è contenuta in molti prodotti usati come “integratori” anche per finalità cosmetiche a concentrazioni fino a 10 mg/d.<sup>30</sup> La biotina interferisce con il sistema streptavidina-biotina usato in molti test immunometrici per potenziare il segnale, con effetti di FP nei metodi competitivi e FN in quelli sandwich.<sup>31</sup> In relazione alle concentrazioni ematiche, può produrre risultati FN o solo diminuzione dei valori, in presenza di elevate quantità di cTn circolante. Secondo IFCC,<sup>32</sup> componenti biotinilati sono presenti nei disegni

analitici di Biomerieux (Bagno a Ripoli, FI, Italia), Ortho Clinical Diagnostics (Milano, Italia), Radiometer Medical (Brønshøj, Denmark) (cTnI), Roche (Monza, MB, Italia), Siemens (Milano, Italia), Singulex (Alameda, CA, USA). Sono state riportate interferenze FN (-37%) nel metodo LOCI Siemens oltre i 300 ng/ml<sup>7</sup> e le conseguenze negative sul piano diagnostico dell’interferenza sono state descritte per il metodo Roche Gen5<sup>8</sup> ma non Gen4.<sup>30</sup> FDA il 28 novembre 2017 ha emesso uno specifico *warning*.<sup>33</sup> Una recente pubblicazione del *Committee on Cardiac Biomarkers* di IFC,<sup>34</sup> che riporta una tabella con le caratteristiche dei metodi di cTn e hs-cTn suscettibili o meno all’interferenza, suggerisce misure analitiche per fronteggiare il problema (utilizzare metodi non interferiti, adsorbire l’eccesso di biotina nel siero) ma ammette che non sono pratici e possono indurre comunque inaccurately di determinazione di cTn.<sup>9</sup> Poiché si tratta di situazioni piuttosto rare (<0.5%) (la concentrazione di biotina nel sangue è compresa di norma tra 0,12 e 0,36 nmol/l, mentre le concentrazioni che possono interferire in alcune metodiche sono più alte di centinaia di volte da 30 nmol/l a 300 nmol/l), Dorizzi<sup>35</sup> suggerisce di intercettare i pazienti conosciuti come supplementati di vitamina B7 a livelli interferenti e applicare correttivi rivolti al paziente (sospendere per qualche giorno le assunzioni massicce di biotina) e/o alla fase analitica utilizzando metodi con

separazione magnetica. Tuttavia, Frame *et al.*<sup>30</sup> notano che il primo di tali accorgimenti non è applicabile nei pazienti con sospetta Sindrome Coronarica Acuta (SCA) e che strategie di blocco della biotina esogena determinano ritardi inaccettabili nella risposta del marcatore cardiaco. Un'accurata anamnesi del paziente sembra essere in questi casi l'unica via percorribile, purché si conosca la possibile interferenza. Si rimanda a quest'ultime referenze bibliografiche per un'approfondita e generale trattazione del tema.

- **Digiuno/lipemia.** Non vi sono dati sull'effetto del mancato digiuno (*light meal*) ma ci sono sull'effetto della lipemia che dipende dalle caratteristiche del paziente.<sup>36</sup> La lipemia interferisce con l'apparato strumentale (difficoltà di aspirazione) e per riduzione del volume disponibile per i substrati (FN). Non si può usare il Lipoclear perché non vi è accettabile recupero di cTn;<sup>37</sup> meglio l'ultracentrifugazione,<sup>38</sup> oppure, ripetere il prelievo in condizioni più fisiologiche (se possibile). Sono situazioni rare.

- **Iperfosfatemia alcalina.** Era stata descritta un'interferenza (FP) da fosfatasi alcalina nei metodi FPIA che usavano ALP come substrato (STRATUS) già a valori di 129 U/l.<sup>39</sup> Più recentemente è stata segnalata per il metodo chemiluminescente Beckman Coulter (Cassina de' Pecchi, MI, Italia) Access AccuTnI+3<sup>11</sup> e hs, anche a concentrazioni nella norma (58 U/L) di fosfatasi alcalina serica.<sup>10</sup> Interferenza rara.

- **Ittero/iperbilirubinemia.** Valori molto elevati di bilirubina (>10 mg/dl) sono stati segnalati interferire negativamente (FN) i metodi Abbott (Roma, Italia) sia cTn che hs-cTn, ma non i metodi Siemens (cTn e hs) e Roche.<sup>15</sup> Situazioni rare.

- **Emolisi *in vivo*.** Può dipendere da malattie del soggetto, ma più frequentemente da manovre di prelievo.<sup>40</sup> Le anemie emolitiche ereditarie possono dipendere da difetti della sintesi emoglobinica (talassemia, anemia falciforme), da difetti della membrana eritrocitaria (sferocitosi ed ellisocitosi ereditarie, emoglobinuria parossistica notturna), da difetti del metabolismo eritrocitario e da deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi e piruvato-chinasi. Le patologie acquisite comprendono quelle immunomediata (da micoplasma pneumonie, nelle patologie autoimmuni come LES, LLC, da anemia emolitica autoimmune), l'ipersplenismo, i traumi e le ustioni, le infezioni da malaria o clostridi, il danneggiamento "meccanico" in circolo (coagulazione intravascolare disseminata, sindrome emolitico-uremica, porpora trombotica trombocitopenica, da valvole cardiache, sindrome HELLP), le trasfusioni incongrue, da farmaci, tossine ed altre cause più rare. Una

corretta anamnesi del paziente indicherà il meccanismo patogenetico. Le misure di rivelazione e risoluzione sono comuni all'emolisi da prelievo.<sup>40</sup>

### Prelievo

- **Emolisi *in vitro*.** I campioni chiaramente emolitici sono circa il 3% dei campioni giornalieri nella routine, di più (8.8%) in urgenza (DE); definiti dalla modifica visibile del colore del campione (da rosa a rosso) che corrisponde a >0,3 g/l di emoglobina libera nel plasma.<sup>41</sup> L'interferenza può essere negativa (FN) come su cTnT Roche o cTnI LOCI Siemens oppure positiva (FP) come su cTnI ORTHO o Abbott a livelli però molto diversi: 0,3 g/l,<sup>41</sup> 0,6 g/l,<sup>36</sup> <1 g/l,<sup>42</sup> 1,9 g/l.<sup>43</sup> Secondo Bais,<sup>43</sup> un'alterazione del 20% di concentrazione di troponina (considerata critica nel *rise and fall* diagnostico) è rinvenibile a 150 indice di emolisi. In ogni caso l'effetto dipende dall'entità dell'emolisi (tanto maggiore l'emolisi, tanto maggiore l'effetto interferente) e dalle concentrazioni di cTn (tanto più basse, tanto più evidente l'effetto interferente). L'effetto è diretto tipo "quenching" ma se l'attesa del campione è prolungata anche per rilascio di proteasi. Una recente pubblicazione di IFCC C-CB<sup>33</sup> riassume i dati conosciuti dell'interferenza dell'emoglobina sui metodi per cTn e hs-cTn: in generale essi dovrebbero essere non interferiti fino a concentrazioni di 2, 5 o 10 g/l. I criteri generali di non accettabilità dei campioni emolitici sono sufficienti a controllare il problema, ma esistono resistenze diffuse alla loro applicazione.<sup>40</sup>

- **Fibrina.** Errate manovre di prelievo, trasporto e centrifugazione possono determinare presenza di fibrina fino al 2,2% dei campioni,<sup>44</sup> che può determinare intrappolamento dell'enzima indicatore o falsi legami tra fibrina e anticorpi di riconoscimento. L'utilizzo di plasma e di provette con acceleratori e separatori ha diminuito il problema. La ri-centrifugazione è apparsa in grado di diminuire l'interferenza,<sup>45</sup> ma è stata contestata perché potrebbe diminuire la concentrazione di cTn non per risoluzione del problema fibrina ma per degradazione dell'analita, con rischio di mis-classificazione dei pazienti.<sup>46</sup> Tuttavia, esperimenti seppur parziali, eseguiti dal GdS MM SIPMeL mostrano che i metodi hs-cTn non sarebbero proni agli effetti negativi della ri-centrifugazione a differenza di quelli cTn.<sup>47, 48</sup>

- **Materiali (provette e matrici).** Non ci sono studi definitivi sull'impatto dei materiali di prelievo come interferenti nella determinazione della cTn,<sup>5</sup> anche se potenzialmente importanti nell'accurata separazione siero/plasma e nella formazione del coagulo. Tuttavia, l'uso di provette a separazione rapida (RST) non ha portato quei benefici attesi in termini di diminuzione di FP in cTnT e

cTnI Beckman.<sup>49</sup> Neanche per l'effetto della matrice ci sono studi definitivi,<sup>5</sup> tuttavia ciascun metodo ha individuato la propria: plasma-eparina (cTnT e hs-cTnT, cTnI e hs-cTnI Siemens nelle diverse versioni e strumenti, cTnI ORTHO, cTnI e hs-cTnI Beckman, cTnI Abbott Architect e i-STAT) o EDTA (cTn Alere Triage, hs-cTn Abbott, cTn Pathfast) o siero.<sup>50</sup> Poiché variazioni in senso negativo o positivo sono state segnalate un po' per tutti i metodi sia cTn che hs-cTn con l'uso alternato di plasma e/o siero, si raccomanda di utilizzare tassativamente la matrice indicata come preferenziale dal produttore e di non mescolare dati provenienti da matrici diverse (Raccomandazione 6 di Wu *et al.*).<sup>51</sup>

### Cause analitiche di FP e FN di troponina

#### Strumento

I *fliers* o *outliers* sono quei dati spuri, random, non ripetibili, di solito FP, molto variabili in dimensioni (da piccole variazioni a 100x) non legati alla variabilità analitica, non clinicamente motivati e dipendenti da micro-coaguli o debris e/o pulizia non ottimale del sistema e/o *robustness* del sistema.<sup>5</sup> Con i metodi hs-cTn sono probabilmente meno frequenti (0,13% per hs-cTnT; 0,59% per hs-cTnI).<sup>26</sup> In ogni caso non sono state segnalate mis-classificazioni, perché non rilevanti clinicamente oppure facilmente intercettati.

#### Metodo

Va sempre ricordato che dati provenienti da metodi diversi (cTn T vs cTn I; 22 metodi per I; diverse generazioni dello stesso test; diverso strumento per stessa metodica; diversa matrice) non sono immediatamente comparabili;<sup>51</sup> che TAE (*Total Analytical Error*)<sup>52</sup> e RCV (*Reference Change Value*)<sup>53</sup> sono elevati; che i valori di troponina vanno considerati nella serie nella diagnostica di sindrome coronarica acuta (SCA). Quindi la variabilità analitica è grande e gli sforzi di armonizzazione sono per ora contraddittori.<sup>5,6</sup> Tuttavia, sono assolutamente critici per risultati affidabili la verifica delle performance all'inizio del nuovo metodo (Raccomandazione 2 di Wu *et al.*),<sup>51</sup> la verifica giornaliera della calibrazione e la calibrazione lotto-lotto,<sup>5</sup> il CQI (Controllo di Qualità Interno) giornaliero su 3 livelli di cui uno vicino al 99° percentile (Raccomandazione 1 di Wu *et al.*)<sup>51</sup> e il controllo sistematico dei reagenti.<sup>5</sup>

#### Analita

La stabilità dell'analita non sembrerebbe avere problemi sul breve termine a 4 °C, -20 °C, -70 °C ma non tutti i metodi sono uguali e i dati non sono conclusivi: è comunque

meglio non oltrepassare le 2 ore;<sup>54</sup> sul lungo termine c'è qualche studio che segnala decrementi di 0.4 ng/l/anno ma anche qui dipende in parte dai metodi.<sup>55</sup>

#### Campione

Si tratta di interferenze immunologiche legate ad anticorpi eterofili (HA) e/o anticorpi umani anti-topo (HAMA), Fattore Reumatoide (RF), macrotroponina — che danno prevalentemente FP — e anticorpi anti cTn o contro reagenti come biotina o streptavidina — che danno FN.

- HA sono prodotti in corso di infezioni, contro antigeni non ben definiti, hanno specificità multipla e debole; HAMA sono, invece, anticorpi contro antigeni ben definiti e sono dotati di forte affinità, prodotti di solito dopo trattamento con immunoglobuline animali o altre forme di contatto.<sup>56</sup> I dati sulla loro prevalenza sono contraddittori ma quello che viene più citato proviene da Fleming *et al.*:<sup>57</sup> fino al 3.1% dei pazienti in generale e fino al 14.8% dei pazienti con sospetta SCA. Determinano più frequentemente FP perché legano i 2 anticorpi del metodo sandwich in assenza di antigene (cTn); talora FN in quanto ostacolano il legame tra l'antigene e uno dei 2 anticorpi di cattura o rivelazione. I metodi più semplici di individuazione sono una prova di diluizione (il valore non cambia nelle successive diluizioni al raddoppio) e/o un blocco con agenti anti HA (del commercio o sieri animali) che rimuovono l'interferenza. I metodi attuali contengono agenti bloccanti HA/HAMA e hanno ridotto l'incidenza dei FP/FN ma non del tutto e metodi diversi si comportano diversamente con plasmidi identici, quindi testare con un altro sistema (metodo/strumento) può essere utile. Anche negli anni recenti è l'interferenza più comune.<sup>58</sup>

- Fattore reumatoide. È presente in molti pazienti di malattie autoimmuni ma anche nel 5% dei soggetti sani e nell'1% dei pazienti con sospetta SCA.<sup>59</sup> Può dare FP con un'interferenza simile a quella degli HA in particolare quelli IgM. Dopo segnalazioni degli anni 90 in particolare nei metodi MEIA (Abbott), l'uso di antisieri policlonali aggiunti ha di fatto eliminato il problema,<sup>12</sup> che si è dimostrato essere almeno in parte legato alla co-presenza di HA.<sup>60</sup>

- Macrotroponina. Si tratta di immunocomplessi di troponina e gammaglobuline che producono molecole di circa 500 kD in grado di reagire con gli anticorpi dei metodi *sandwich*. Segnalate con cTnI,<sup>60</sup> sono presenti anche con hs-cTnI in prevalenze fino a 5% dei pazienti con sospetta SCA con il metodo Abbott.<sup>24</sup> I valori sono di solito sotto i 100 ng/l ma possono essere confondenti. Talora presentano valori molte volte superiori a URL. La verifica (una

volta esclusa l'interferenza da HA) è data dalla precipitazione con PEG 8000 al 25% in PBS, incubato 1:1 per 10 min e poi centrifugato (recupero <15%) e dal trattamento con Protein A/G/L-Sepharose e la conferma dalla cromatografia di gel filtrazione che consente di individuare il complesso immune nell'eluato.<sup>24</sup>

• Anticorpi anti cTn. Gli anticorpi anti cTnI (ATIA) sono stati identificati in soggetti sani (attenzione a IMA silenti e ai danni non ischemici: determinano autoanticorpi nel 9.3%), e pazienti con miocardiopatia cronica dilatativa (DCM), cardiomiopatia ipertrofica e cardiopatia ischemica (ICM);<sup>61</sup> quelli anti cTnT (ATTA) in soggetti sani e pazienti affetti da miocarditi, ICM e DCM con prevalenza del 10%.<sup>62</sup> Sono quindi collegati allo smascheramento di epitopi tramite due vie T-cell indipendente (tipo LPS) o per T-cell auto-reattive; la persistenza in circolo favorisce l'autoimmunità. Possono avere effetti patologici come la formazione di immunocomplessi oppure alterando il *signaling* intracellulare del Ca<sup>++</sup>.<sup>63</sup> Interferiscono con il *midfragment* 30-110 di cTnI, impedendo il riconoscimento degli anticorpi del *sandwich* (FN). La discrepanza tra STEMI (confermato da ECG) e valori negativi di cTn di solito fa sorgere il sospetto. La conferma è con l'uso di altri metodi per cTn che non abbiano epitopi di riconoscimento nel frammento incriminato e/o con il mix con un siero sicuramente positivo che si negativizza.<sup>64</sup>

## Discussione

L'elenco ragionato delle cause possibili di FP/FN di cTn e l'allegata Tabella forniscono un quadro sufficientemente completo per una conoscenza del problema ai fini di pratica quotidiana. L'attenzione è stata focalizzata alle cause analitiche e deliberatamente non alle cosiddette specificità di patologia né a quelle tissutali, anche se il tema dell'innalzamento della cTnT nella malattia renale<sup>65-67</sup> e del riconoscimento di troponine omologhe scheletriche<sup>13, 68</sup> sono temi controversi nella diagnostica delle SCA e nell'uso della troponina.

I limiti del lavoro possono essere i seguenti. La ricerca bibliografica non è stata sistematica; tuttavia l'obiettivo era di isolare i lavori più utili alla comprensione del problema e, in primis, alla definizione di un compendio ragionato delle cause, rispetto al quale la qualità delle referenze era più importante dell'esaustività della ricerca. Inoltre, non sono state inserite tra le cause le interferenze da anticorpi monoclonali somministrati al paziente per motivi diagnostici o terapeutici, perché, pur segnalate come potenziale causa di rilievo, ad oggi si tratta più di segnalazioni spe-

culative che di dati approfonditi da ricerche analitiche e causali.<sup>12, 13</sup>

La consapevolezza della possibilità di interferenze con FP/FN nei metodi della troponina e indicazioni per la prevenzione, il contenimento e la risoluzione dei problemi conseguenti a FP/FN erano presenti già nel documento NACB del 1999<sup>69</sup> e più dettagliatamente nel documento sulle specifiche di qualità di cTn del 2001 (specificità anticorpale, calibrazione, imprecisione analitica, specificità del metodo; matrice, provette, stabilità *in vitro*).<sup>70</sup> Nell'agosto 2005, l'Office of In vitro Diagnostic Device Evaluation and Safety (OVID) di United States Food and Drug Administration (FDA), su input di Advanced Medical Technology Association (AdvaMed), emette un Alert riguardo FP di troponina, ripreso e pubblicato da Lum *et al.* nel 2006.<sup>60</sup>

Più recentemente, vi è stata una ripresa di attenzione legata a nuovi fattori interferenti venuti alla ribalta (FN da autoanticorpi anti cTn; biotina, anticorpi monoclonali terapeutici o diagnostici) e dalla necessità di puntualizzare questi aspetti con le nuove hs-cTn. Nel 2014 Vafaie *et al.*<sup>28</sup> presentano un algoritmo clinico-laboratoristico per la gestione dei risultati sospetti, nel 2017 Herman *et al.*<sup>5</sup> descrivono le caratteristiche della variabilità ed errore nella determinazione di troponina che contiene anche i FP/FN e sempre nel 2017 Mair *et al.*<sup>6</sup> propongono un algoritmo prevalentemente clinico di gestione dei valori problematici di cTn. Nel 2018, le Raccomandazioni del III LMPG Committee di AACC<sup>51</sup> contengono indicazioni generali (Raccomandazione 1 su CQ) e specifiche (Raccomandazione 6 e 7 su variabili analitiche e preanalitiche) utili ai fini del contenimento dei FP/FN.

## Conclusioni

A nostro avviso e sulla base della presente ricerca, rispetto al tema dei FP/FN di troponina mancano a tutt'oggi raccomandazioni di buona pratica standardizzate, robuste ed esaustive e facilmente utilizzabili nella quotidianità del laboratorio di patologia clinica.

## Bibliografia

1. Katrukha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 2013;78:1447-65.
2. Apple FS. The specificity of biochemical markers of cardiac damage: a problem solved. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1085-9.
3. de Lemos JA, Morrow DA, deFilippi CR. Highly sensitive troponin assays and the cardiology community: a love/hate relationship? *Clin Chem* 2011;57:826-9.

4. Garg P, Morris P, Fazlanie AL, Vijayan S, Dancso B, Dastidar AG, *et al.* Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin. *Intern Emerg Med* 2017;12:147–55.
5. Herman DS, Kavsak PA, Greene DN. Variability and error in cardiac troponin testing. An ACLPS critical review. *Am J Clin Pathol* 2017;148:281–95.
6. Mair J, Lindahl B, Müller C, Giannitsis E, Huber K, Möckel M, *et al.* What to do when you question cardiac troponin values. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018;7:577–86.
7. Willeman T, Casez O, Faure P, Gauchez AS. Evaluation of biotin interference on immunoassays: new data for troponin I, digoxin, NT-Pro-BNP, and progesterone. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:e226–9.
8. Trambas C, Lu Z, Yen T, Sikaris K. Characterization of the scope and magnitude of biotin interference in susceptible Roche Elecsys competitive and sandwich immunoassays. *Ann Clin Biochem* 2018;55:205–15.
9. Schrapf A, Fraissinet F, Hervouet C, Girot H, Brunel V. Biotin and high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28:030901.
10. Herman DS, Ranjitar P, Yamaguchi D, Grenache DG, Greene DN. Endogenous alkaline phosphatase interference in cardiac troponin I and other sensitive chemiluminescence immunoassays that use alkaline phosphatase activity for signal amplification. *Clin Biochem* 2016;49:1118–21.
11. Marinheiro R, Amador P, Parreira L, Rato Q, Caria R. False Positive Troponin I Rendering Two Admissions for “Recurrent Acute Myopericarditis”. *Open Cardiovasc Med J* 2018;12:55–8.
12. Nguyen J, Thachil R, Vyas N, Marino T. Falsely elevated troponin: rare occurrence or future problem. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 2016;6:32952.
13. Bellan M, Pirisi M, Bellomo G, Sainaghi PP. A case of false positive Troponin I in a patient affected by cryoglobulinemic vasculitis. *Reumatismo* 2017;69:40–2.
14. Vilchez-Monge AL, Garutti I, Lisbona CJ, Olmedilla L, Perez-Peña JM. Are high-sensitivity troponins always reliable? Donor-recipient troponin transfusion in liver transplantation. *Br J Anaesth* 2018;121:1212–4.
15. Simons J, Beach L, Clark L, Kavsak PA. Matrix and bilirubin interference for high-sensitivity cardiac troponin I. *Clin Chim Acta* 2015;442:49–51.
16. Lippi G, Ardisino D, Aloe R, Cervellini G. A false positive case of cardiac troponin I identified with CK-MB reflex testing. *Int J Cardiol* 2014;176:e3–4.
17. Franeková J, Bláha M, Bělohoubek J, Kotrbatá M, Sečnik P Jr, Kubiček Z, *et al.* A clinical and laboratory approach used to elucidate discordant results of high-sensitivity troponin T and troponin I. *Clin Chim Acta* 2015;446:128–31.
18. Ben Lassoued A, Fromont J, Marlinge M, Basset N, Chefrou M, Vairo D, *et al.* A case of false positive cardiac troponin I in CANOMAD syndrome. *Int J Cardiol* 2016;222:359–60.
19. Kaplan A, Orhan N, Ilhan E. False Positive Troponin Levels due to Heterophil Antibodies in a Pregnant Woman. *Turk J Emerg Med* 2016;15:47–50.
20. Nørlund H, Bovin A. [False positive troponin I due to heterophile antibodies]. *Ugeskr Laeger* 2017;179:V05170412. Danish.
21. Warade J. Retrospective Approach to Evaluate Interferences in Immunoassay. *EJIFCC* 2017;28:224–32.
22. Manjunath L, Yeluru A, Rodriguez F. 27-Year-Old Man with a Positive Troponin: A Case Report. *Cardiol Ther* 2018;7:197–204.
23. Ayan M, Gheith Z, Ananthula A, Salih M, Vallurupalli S, Mehta JL. Multiple admissions to the coronary care unit due to falsely elevated cardiac troponin. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2018;31:197–9.
24. Warner JV, Marshall GA. High incidence of macrotroponin I with a high-sensitivity troponin I assay. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1821–9.
25. Wilgen U, Pretorius CJ, Gould MJ, Ungerer JP. Cardiac Troponin I carryover by very high patient samples still causes false-positive results on the Beckman Coulter AccuTnI+3. *Ann Clin Biochem* 2016;53:177–9.
26. Sawyer N, Blennerhassett J, Lambert R, Sheehan P, Vasikaran SD. Outliers affecting cardiac troponin I measurement: comparison of a new high sensitivity assay with a contemporary assay on the Abbott ARCHITECT analyser. *Ann Clin Biochem* 2014;51:476–84.
27. Zaninotto M, Clerico A, Casagrande I, Galvani M, Plebani M. A false positive case of cardiac troponin I: which diagnostic approach? *Int J Cardiol* 2014;177:e42–3.
28. Vafaie M, Biener M, Mueller M, Schnabel PA, André F, Steen H, *et al.* Analytically false or true positive elevations of high sensitivity cardiac troponin: a systematic approach. *Heart* 2014;100:508–14.
29. Okyay K, Yıldırım A. The preanalytical and analytical factors responsible for false-positive cardiac troponins. *Anatol J Cardiol* 2015;15:264–5.
30. Frame IJ, Joshi PH, Mwangi C, Günsolus I, De Lemos JA, Das SR, *et al.* Susceptibility of Cardiac Troponin Assays to Biotin Interference. *Am J Clin Pathol* 2019;151:486–93.
31. Biotin Interference [Internet]. Disponibile alla pagina: <http://www.clpmag.com/2018/01/inside-track-biotin-gets-safety-alert/> [citato 12 febbraio 2019].
32. Cardiac Troponin Assay Biotin and Hemolysis Interference Table by Manufacturers. IFCC Committee on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers (C-CB) [Internet]. Disponibile alla pagina: [http://www.ifcc.org/media/477243/040218\\_ifcc-c-cb-troponin-interference-table-040218.pdf](http://www.ifcc.org/media/477243/040218_ifcc-c-cb-troponin-interference-table-040218.pdf) [citato 12 febbraio 2019].
33. The FDA Warns that Biotin May Interfere with Lab Tests: FDA Safety Communication [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/fda-warns-biotin-may-interfere-lab-tests-fda-safety-communication> [citato 12 febbraio 2019].
34. Saenger AK, Jaffe AS, Body R, Collinson PO, Kavsak PA, Lam CS, *et al.* Cardiac troponin and natriuretic peptide analytical interferences from hemolysis and biotin: educational aids from the IFCC Committee on Cardiac Biomarkers (IFCC C-CB). *Clin Chem Lab Med* 2019;57:633–40.
35. Dorizzi RM. Biotina e interferenze nei metodi immunologici; problemi e opportunità. *Riv Ital Med Lab* 2017;13:1–9.
36. Cemin R, Daves M. Pre-analytic variability in cardiovascular biomarker testing. *J Thorac Dis* 2015;7:E395–401.
37. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med (Zagreb)* 2014;24:57–67.
38. Saracevic A, Nikolac N, Simundic AM. The evaluation and comparison of consecutive high speed centrifugation and LipoClear® reagent for lipemia removal. *Clin Biochem* 2014;47:309–14.
39. Dasgupta A, Chow L, Wells A, Datta P. Effect of elevated concentration of alkaline phosphatase on cardiac troponin I assays. *J Clin Lab Anal* 2001;15:175–7.
40. Lippi G, Caputo M, Banfi G, Daves M, Dolci A, Montagnana M, *et al.* Raccomandazioni di consenso SIBioC-SIMEI per la rilevazione e gestione dei campioni emolizzati e utilizzo dell'indice di emolisi. *Riv Ital Med Lab* 2011;7:144–55.
41. Florkowski C, Wallace J, Walmsley T, George P. The effect of hemolysis on current troponin assays—a confounding preanalytical variable? *Clin Chem* 2010;56:1195–7.
42. Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS, Katus HA. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem* 2010;56:254–61.
43. Bais R. The effect of sample hemolysis on cardiac troponin I and T assays. *Clin Chem* 2010;56:1357–9.
44. Roberts WL, Calcote CB, De BK, Holmstrom V, Narlock C, Apple FS. Prevention of analytical false-positive increases of cardiac troponin I on the Stratus II analyzer. *Clin Chem* 1997;43:860–1.
45. Pfäfflin A. Doubt on prevention of false-positive results of cardiac troponin I by recentrifugation. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:892–3.

46. Canovi S, Campioli D, Marcheselli L. Specimen recentrifugation and elevated troponin I levels. *Lab Med* 2015;46:47–50.
47. Marino G, Galli GA, Malloggi L, Moretti M, Morandini M, Manno M, *et al.* Interferenze sui valori di hs-cTnI: effetto della centrifugazione ripetuta. Poster 033, 4° Congresso Nazionale SIPMeL, Catania 23-25 ottobre 2018 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.sipmel.it/soci/documenti/112262> [citato 12 febbraio 2019].
48. Marino G, Burgio MA, Galli GA, Moretti M, Rubin D, Manno M, *et al.* Interferenze sui valori di cTnI: effetto della centrifugazione ripetuta. Poster 034, 4° Congresso Nazionale SIPMeL, Catania 23-25 ottobre 2018 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.sipmel.it/soci/documenti/112262> [citato 12 febbraio 2019].
49. Strathmann FG, Ka MM, Rainey PM, Baird GS. Use of the BD vacutainer rapid serum tube reduces false-positive results for selected beckman coulter Unicel DxI immunoassays. *Am J Clin Pathol* 2011;136:325–9.
50. Christenson RM, Jacobs E, Uettwiller-Geiger D, Estey MP, Lewandowski K, Koshy TI, *et al.* Comparison of 13 Commercially Available Cardiac Troponin Assays in a Multicenter North American Study. *JALM* 2017;3:544–61.
51. Wu AH, Christenson RH, Greene DN, Jaffe AS, Kavsak PA, Ordoñez-Llanos J, *et al.* Clinical Laboratory Practice Recommendations for the Use of Cardiac Troponin in Acute Coronary Syndrome: Expert Opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645–55.
52. Kavsak PA, Jaffe AS, Greene DN, Christenson RH, Apple FS, Wu AHB. Total Analytical Error of low cardiac troponin concentration ( $\leq 10$  ng/L) by the use of a high-sensitivity cardiac troponin assay. *Clin Chem* 2017;63:1043–5.
53. Frankenstein L, Wu AH, Hallermayer K, Wians FH Jr, Giannitsis E, Katus HA. Biological variation and reference change value of high-sensitivity troponin T in healthy individuals during short and intermediate follow-up periods. *Clin Chem* 2011;57:1068–71.
54. Peake RW, Deans KA, Croal BL. A practical assessment of the short-term in vitro stability of troponin I at the 99 th percentile. *Ann Clin Biochem* 2011;48:377–9.
55. Kavsak PA, MacRae AR, Yerna MJ, Jaffe AS. Analytic and clinical utility of a next-generation, highly sensitive cardiac troponin I assay for early detection of myocardial injury. *Clin Chem* 2009;55:573–7.
56. Lippi G, Aloe R, Meschi T, Borghi L, Cervellin G. Interference from heterophilic antibodies in troponin testing. Case report and systematic review of the literature. *Clin Chim Acta* 2013;426:79–84.
57. Fleming SM, O’Byrne L, Finn J, Grimes H, Daly KM. False-positive cardiac troponin I in a routine clinical population. *Am J Cardiol* 2002;89:1212–5.
58. Morton A. When lab tests lie ... heterophile antibodies. *Aust Fam Physician* 2014;43:391–3.
59. Roongsritong C, Warraich I, Bradley C. Common causes of troponin elevations in the absence of acute myocardial infarction: incidence and clinical significance. *Chest* 2004;125:1877–84.
60. Lum G, Solarz DE, Farney L. False Positive Cardiac Troponin Results in Patients Without Acute Myocardial Infarction. *LABMEDICINE* 2006;37:546–50.
61. Adamczyk M, Brashear RJ, Mattingly PG. Circulating cardiac troponin-I auto-antibodies in human plasma and serum. In: Shoenfeld Y, Gershwin ME, editors. *Contemporary challenges in autoimmunity*. New York: Blackwell Publishing; 2009. p. 67–74.
62. Adamczyk M, Brashear RJ, Mattingly PG. Prevalence of auto-antibodies to cardiac troponin T in healthy blood donors. *Clin Chem* 2009;55:1592–3.
63. O’Donohoe TJ, Ketheesan N, Schrale RG. Anti-troponin antibodies following myocardial infarction. *J Cardiol* 2017;69:38–45.
64. Bodor GS. Does this patient have acute myocardial infarction? *Clin Chem* 2017;63:439–40.
65. Chung JZ, Dallas Jones GR. Effect of renal function on serum cardiac troponin T—population and individual effects. *Clin Biochem* 2015;48:807–10.
66. Mingels AM, Cardinaels EP, Broers NJ, van Sleetuwen A, Streng AS, van Diejen-Visser MP, *et al.* Cardiac troponin T: smaller molecules in patients with End-Stage Renal Disease than after onset of Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem* 2017;63:683–90.
67. Eggers KM, Lindahl B, Carrero JJ, Evans M, Szummer K, Jernberg T. Cardiac troponins and their prognostic importance in patients with suspected Acute Coronary Syndrome and Renal Dysfunction. *Clin Chem* 2017;63:1409–17.
68. Schmid J, Liesinger L, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, Scharnagl H, Dieplinger B, *et al.* Elevated cardiac troponin T in Patients with skeletal myopathies. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:1540–9.
69. Wu AH, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem* 1999;45:1104–21.
70. Panteghini M, Gerhardt W, Apple FS, Dati F, Ravkilde J, Wu AH. Quality specifications for cardiac troponin assays. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:175–9.

*Conflitti di interesse.*—Gli autori dichiarano di non aver alcun conflitto di interesse.

*Studi condotti su esseri umani e animali.*—L’articolo non contiene alcuno studio eseguito su esseri umani e su animali da parte degli autori.

*Consenso informato.*—Per questo tipo di studio non è richiesto il consenso informato.

Pubblicato online: 21 giugno 2019. - Accettato: 18 febbraio 2019. - Ricevuto: 12 febbraio 2019.