

RACCOMANDAZIONI E LINEE GUIDA

Il problema dei falsi positivi e falsi negativi di troponina. Parte IV: Raccomandazioni del Gruppo di Studio sui Marcatori Miocardici (GdS MM) SIPMeL

The issue of false positive and false negative results of troponin. Part IV: recommendations by SIPMeL Working Group on Myocardial Markers (GdS MM)

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

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

RIASSUNTO

Le interferenze analitiche nei metodi per la troponina (cTn) e la troponina ad alta sensibilità (hs-cTn) sono descritte ampiamente in letteratura, ma di solito in modo frammentario e solo talvolta con l'obiettivo di una sistematicità di revisione e di linee guida per affrontare il problema nella pratica clinica. Anche se l'incidenza di falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN) di cTn e hs-cTn è inferiore o vicina all'1%, tuttavia essi vanno riconosciuti perché potenzialmente pericolosi. Emerge, quindi, la necessità di raccomandazioni di buona pratica esaustive e utilizzabili nella quotidianità dell'attività del Laboratorio clinico. Il GdS MM SIPMeL, con metodo Delphi modificato, ha stilato 10 "Raccomandazioni per la prevenzione e la correzione dei FP/FN", utilizzando i criteri di Forza delle Raccomandazioni e Livello delle Evidenze secondo LMPG NACB/AACC, e uno "Schema d'azione" per la risoluzione del FP/FN di cTn. Il *Position Paper* è stato pubblicato sul sito societario dal 12 settembre al 18 dicembre 2018 ed è stato sottoposto alla valutazione esterna della Commissione Qualità e del GdS EBLM di SIPMeL. Le prime tre Raccomandazioni sintetizzano le misure preventive nei confronti di FP/FN strumentali a carico del Laboratorio. Le seconde tre Raccomandazioni

sono finalizzate ad offrire una sequenza logica al clinico nel caso di sospetto FP/FN di cTn e a sottolineare l'esigenza della collaborazione clinica-laboratorio. Le Raccomandazioni 7-9 suggeriscono i percorsi logici che il Laboratorio dovrebbe seguire per la soluzione del sospetto FP/FN analitico. Infine, la Raccomandazione 10 insiste sulla raccolta dei dati a fini di qualità del singolo laboratorio e di costruzione di "evidenze" scientifiche ben strutturate e sul coinvolgimento dei produttori. Le Raccomandazioni possono essere un utile strumento nella pratica quotidiana del laboratorio per la prevenzione e soluzione dei FP/FN di cTn e un riferimento per un colloquio con il clinico indispensabile per una gestione globale dei dati di cTn incongruenti e le loro cause, comprese quelle derivanti da interferenze analitiche e preanalitiche.

(Per citare questo articolo: Veneziani F, Moretti M, Stenner E, Manno 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 IV: Raccomandazioni del Gruppo di Studio sui Marcatori Miocardici (GdS MM) SIPMeL. Riv Ital Med Lab 2019;15:150-8. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00019-7)

Parole chiave: Troponina; Falsi positivi; Falsi negativi.

ABSTRACT

The analytical interferences in troponin (cTn) and high sensitivity troponin (hs-cTn) methods are extensively described in the scientific literature, usually as clinical cases and rarely as systematic reviews with the aim to give guidance for clinical practice. The incidence of false positives (FP) and false negatives (FN) of cTn and hs-cTn is $\leq 1\%$, nevertheless they should be detected for their potentially clinical risk. Then, comprehensive good practice recommendations for the everyday clinical laboratory are needed. The GdS MM SIPMeL defined ten "Recommendations for the prevention and correction of FP/FN of cTn", using the criteria of Strength of Recommendations and Level of Evidence according to NACB LMPG/AACC and by a modified Delphi method, and a "Pattern of action" for the resolution the FP/FN of cTn. The Position Paper was posted on the SIPMeL website from 12 September to 18 December 2018 and submitted to an external evaluation of GdS EBLM and Quality Committee of SIPMeL. The first three Recommendations summarize the preventive measures against FP/FN to be implemented by the Laboratory. The second three Recommendations are designed to provide a logical sequence to the clinician in the case of suspected FP/FN of cTn and to highlight the need of clinical-laboratory collaboration. The Recommendations 7-to-9 suggest logical paths to solve the suspicion of analytical FP/FN that the Laboratory should follow. Finally, the Recommendation 10 insists on collecting data for a quality assurance of the laboratory as well as for the construction of scientific evidence and on the need of a positive collaboration with the manufacturers. The Recommendations can be a useful tool in the laboratory daily practice for the prevention and solution of FP/FN of cTn and a reference to the clinical management of suspected analytical and preanalytical "false" cTn results.

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

Introduzione

Il problema dei falsi positivi (FP) e dei falsi negativi (FN) di troponina (cTn), anche per i metodi ad alta sensibilità (hs-cTn), rappresenta una costante nella letteratura scientifica, dove però non esistono raccomandazioni strutturate e complete di buona pratica di laboratorio.¹ D'altra parte i Laboratori italiani hanno consapevolezza del problema in poco più di un terzo dei casi e mettono in atto misure di prevenzione e di contenimento in circa un quarto dei rispondenti alla IV Indagine del GdS MM SIPMeL sull'uso dei marcatori miocardici in Italia.² Lo scopo del nostro lavoro è stato di fornire una guida comportamentale e interpretativa facilmente applicabile nella pratica laboratoristica per prevenire le interferenze analitiche e preanalitiche e risolvere il sospetto di un FP/FN di cTn, minimizzando le conseguenze di una tale evenienza.

Un punto da chiarire è il diverso significato che viene dato ai FP/FN di cTn nella letteratura scientifica.² Quando

parliamo di "specificità" di cTn, infatti, dobbiamo distinguere bene se parliamo di specificità tessutale (sono le cTn cardio-specifiche?), di specificità clinica (la cTn individua i pazienti sani rispetto alla patologia ischemica?) o di specificità analitica (i metodi di cTn sono interferiti?).

Le troponine sono cardio-specifiche

La specificità tessutale assoluta di cTnI è data dalla sua genetica: 3 geni codificano per le 3 isoforme di cTnI cardiaca, muscolo-scheletrica veloce e muscolo-scheletrica lenta. Il gene per la cTnI cardiaca è posizionato sul cromosoma 19 (19q13.4) ed è costituito da 6 esoni e 7 introni. L'esone 3 è assente nei geni della cTnI scheletrica; esso determina gran parte del *domain* N-terminale, specifico della cTnI cardiaca, che è una proteina di 209 aa con massa molecolare di 24 kDa.³

La storia della specificità tessutale di cTnT è più dinamica. Anche qui 3 geni per 3 isoforme. Il gene dell'iso-

forma cardiaca è posto sul cromosoma 1 (1q32.3) ed è costituito da 17 esoni e 16 introni che danno origine ad una proteina di 287 aa e di 35.9 kDa. Lo *splicing* alternativo e l'esone attivo solo nelle forme embrionali determinano più isoforme (da 1 a 4) nel miocardio fetale e in corso di malattia muscolare.³

Riguardo alla cardio-specificità, i problemi ancora in discussione riguardano il comportamento della cTnT nella malattia renale cronica e la ri-espressione di forme fetali in alcune malattie degenerative muscolo-scheletriche.

Già con il test di 2^a generazione, che utilizza la coppia di anticorpi M11.7 e M7, fu dimostrata la cardio-specificità delle isoforme cardiache di cTnT e la diversità in massa molecolare delle forme ri-esprese nella malattia renale cronica.⁴ L'aumento di cTnT in corso di malattia renale,⁵ in parte legata al catabolismo renale dei frammenti di cTnT circolanti,⁶ è ben conosciuta, va interpretata (comandamento 6 di Jaffe: *do not be intimidated by elevations in patients with renal failure*)⁷ e anzi può essere utilizzata, tenuto conto della aumentata sensibilità clinica, in particolare sotto il profilo prognostico.⁸

Anche recentemente sono state segnalate alcune specificità legate alla ri-espressione di forme fetali nelle malattie muscolari.⁹ Tuttavia, si sottolinea come i risultati delle ricerche non dimostrino chiaramente che gli aumenti di cTnT sierica dipendano da ri-espressioni fetali di cTn scheletrica, peraltro dimostrati con studi di proteomica ma senza giungere alla definitiva prova di una identica sequenza aminoacidica,¹⁰ e non piuttosto da un coinvolgimento miocardico legato alla malattia sistemica, messo in luce dall'aumentata sensibilità delle troponine "high sensitivity".¹¹

Specificità clinica di cTn

Per specificità clinica di un marcatore miocardico di Sindrome Coronarica Acuta (SCA) si intende, per definizione, la capacità di identificare i soggetti non affetti da patologia ischemica.¹² Ma non ci si deve attendere dal marcatore troponinico quello che non può dare e cioè l'etiologia del danno miocardico, come chiarito dalle definizioni di infarto del miocardio (IMA) succedutesi dal 2000 fino alla recentissima del 2018.¹²

I livelli di cTn non sono, da soli, in grado di identificare con diagnosi differenziale i pazienti con patologia cardiaca, perché essa non è un biomarcatore di ischemia (che non esiste),¹³ ma esprime solo l'entità del danno miocardico. Altri marcatori, come CK-MB massa, "sembravano" più specifici, solo perché erano meno sensibili e quindi "vedevano" solo i danni più eclatanti di natura ischemica.¹⁴ Questo concetto ampiamente descritto nella definizione di

IMA del 2018,¹² peraltro, era già insito nella prima definizione di SCA/IMA: la troponina svela solo il danno miocardico, l'origine ischemica deve essere provata con altri mezzi (ECG, ecografia, *imaging*, prove da sforzo, ecc.).

Specificità analitica di cTn

Se dunque sappiamo che cTn è tessuto-specifica ma non patologia-specifica, quando parliamo di FP/FN facciamo riferimento agli aspetti analitici, cioè alle possibili interferenze che limitano la capacità dei metodi immunologici utilizzati nella pratica diagnostica di identificare solo la molecola di cTn.

Tutte le successive generazioni (siamo alla 5^a) dei metodi per cTnT si basano sull'uso degli anticorpi di cattura M7 MAb (che riconosce l'epitopo definito dagli aminoacidi 125-131 della porzione centrale della molecola, dedicata al legame con la tropomiosina) e di rivelazione M11.7 MAb (che riconosce l'epitopo definito dagli aminoacidi 136-141, sempre del *domain* centrale).¹⁵

Viceversa, la grande variabilità analitica degli oltre 20 metodi per cTnI^{15, 16} deriva:

- dai diversi anticorpi scelti: nonostante le indicazioni delle specifiche di qualità IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) del 2001¹⁷ di privilegiare epitopi di parte stabile (aa 30-110) si assiste ad una dispersione dei siti epitopici scelti dai vari produttori;
- dal diverso disegno del test (potenziamento segnale; volumi; tempi di incubazione) e dai diversi segnali utilizzati (spettrometria, fluorescenza, chemiluminescenza, elettrochimica);
- dalla diversa sensibilità alle diverse forme di rilascio (complesso ternario TnTIC, complesso binario TnIC predominante, forme libere): non esistono informazioni esaustive su quali forme e in che percentuale vengano riconosciute dai diversi *kit* e se la calibrazione avvenga, come richiesto dalle specifiche di qualità IFCC del 2001,¹⁷ contro un mix rappresentativo di tutte le forme circolanti possibili;
- dalle modificazioni post-traslazionali quali la fosforilazione dei residui serinici 22/23 e 41/42, l'ossidazione dei gruppi SH delle cisteine 80 e 97, la produzione di frammenti (in letteratura si trovano segnalazioni di produzione da 8 a 11 frammenti) e proteolisi.

Il tentativo di rendere omogenei i test per cTnI passa attraverso lo sforzo di standardizzazione operato da AACC (*American Association of Clinical Chemistry*) e NIST (*National Institute for Standardization and Technology*) che ha portato nel passato all'individuazione di un materiale di riferimento (*standard reference material SRM 2921*) con-

tenente complesso TnTIC, la cui applicazione ha dimostrato di diminuire la variabilità dei kit per cTnI da 20-40 volte a 2-5 volte.^{18, 19} Un *Working Group-IFCC* sta provando da tempo a produrre un materiale di riferimento secondario commutabile,²⁰ ma i risultati si fanno attendere anche perché SRM 2921 ha mostrato limiti di conservabilità e di degradazione, al punto che molti considerano l'impresa dell'armonizzazione e standardizzazione dei metodi cTnI non raggiungibile e auspicano piuttosto semplificazioni e unificazioni metodologiche attuate dal mercato.

Interferenze nei metodi di cTn

Le interferenze analitiche nei metodi per la cTn e la hs-cTn sono descritte ampiamente in letteratura,¹ ma di solito in modo frammentario (casi clinici più o meno approfonditi per gli aspetti chimici, fisici e immunologici del loro meccanismo; casi con revisione di letteratura di solito non sistematica) e solo talvolta con l'obiettivo di una sistematicità di descrizione e di linee per affrontare il problema nella pratica clinica.^{7, 10}

Suggerimenti per la prevenzione, il contenimento e la risoluzione dei problemi conseguenti alle interferenze analitiche compaiono in un documento NACB del 1999²¹ e in quello sulle specifiche di qualità di cTn del 2001.¹⁷ Già nel 2006 Lum et al avevano pubblicato una sintesi delle interferenze per i metodi cTn allora conosciuti riprendendo anche un *alert* di FDA su FP di cTn.²² In era di hs-cTn il tema è riemerso¹ e sono stati presentati compendi della variabilità ed errore nella determinazione di troponina²³ e algoritmi clinico-laboratoristici¹⁰ o prevalentemente clinici²⁴ per la gestione dei risultati sospetti di cTn. Nel 2018, le raccomandazioni del *III LMPG Committee* di AACC²⁵ contengono qualche indicazione utile per la prevenzione dei FP/FN di cTn. Recentemente il GdS MM SIPMeL ha stilato un elenco ragionato delle cause di FP/FN di cTn sulla base di una revisione critica quasi-sistematica di letteratura,¹ che insieme alla rilevazione delle azioni messe in atto dai laboratori italiani rispondenti alla IV Indagine sui marcatori miocardici in Italia² e alla ricerca delle informazioni fornite dai documenti dell'Industria produttrice²⁶ offrono un quadro realistico della dimensione, percezione e misure correttive del problema in ambito italiano. Le interferenze di rilevanza clinica paiono essere rare ($\leq 1\%$), anche se con dati riferiti variabili a 10-100 volte.² In letteratura si trovano indicazioni di sintesi di FP/FN inferiori o vicini all'1%.²⁵ Tuttavia, le interferenze vanno riconosciute perché potenzialmente pericolose.^{7, 10, 23, 24}

Emerge, quindi, la necessità di raccomandazioni di buona pratica esaustive e utilizzabili nella quotidianità dell'at-

tività del Laboratorio clinico. Il GdS MM, quindi, propone le seguenti "Raccomandazioni per la prevenzione e la correzione dei FP/FN" e uno "Schema d'azione".

Metodologia

La definizione delle Raccomandazioni si è basata sulle ricerche bibliografiche e sulle conoscenze pratiche del GdS MM.^{1, 2, 26} La determinazione della forza della raccomandazione e del livello delle evidenze è secondo LMPG NACB/AACC. Infatti, benché il metodo GRADE sia ormai internazionalmente accettato per le valutazioni cliniche, NACB (*National Academy of Clinical Pathology*)²⁷ non lo considera adatto per le raccomandazioni di laboratorio in quanto mancano lavori di alta evidenza come gli RCT (*Randomized Clinical Trials*); il rapporto con gli *outcome* è spazialmente e temporalmente distante; la qualità degli studi, anche di accuratezza diagnostica, riconosce molti *bias* (in primis di *blinding*); la maggior parte delle decisioni è presa per consenso (per definizione di bassa qualità di evidenza) e, d'altra parte, è (o dovrebbe essere) prevalente l'interesse e l'obiettivo di raccomandazioni pratiche di *guidance*. NACB adotta, quindi, le indicazioni di *US Preventive Services Task Force*.^{28, 29} Il GdS MM SIPMeL, per consentire un confronto con le raccomandazioni di riferimento e contestualmente per tenere conto della scarsa disponibilità di evidenze forti su molti aspetti del problema, ha scelto di utilizzare come base il sistema utilizzato per le "Raccomandazioni del GdS MM per l'implementazione di POCT di cTn",²⁹ per cui per ciascuna raccomandazione se ne indica la classe/consenso della stessa (I *devi*; IIa è *ragionevole*, IIb *dovresti considerare*; III *non devi*) e il livello/ qualità delle evidenze (A, B, C), così graduato: A - evidenze fondate su studi ben disegnati e ben condotti in popolazioni rappresentative (RCT o revisioni sistematiche o metanalisi); B - evidenze sufficienti ma limitate in numero, qualità, consistenza degli studi individuali; generalizzabili nella pratica (linee guida); o di natura indiretta (standard internazionali); C - evidenze insufficienti per determinare effetti incontrovertibili sugli esiti clinici per la limitatezza in numero o forza degli studi, debolezza di disegno o svolgimento, buchi nella catena delle evidenze o mancanza d'informazioni; opinioni di esperti.³⁰

Il *Position Paper* "Raccomandazioni per la gestione dei FP e dei falsi negativi (FN) di troponina (cTn)", è stato costruito durante il 2018 da parte del GdS MM e presentato, per parti, al convegno del GdS tenutosi a Lecce il 5 maggio 2018 e nella sessione del GdS al congresso nazionale SIPMeL di Catania 23-25 ottobre 2018. È stato reso disponibile ai professionisti, per commenti e osservazioni,

dal 12 settembre al 18 dicembre 2018 sul sito di SIPMeL (https://www.sipmel.it/notizie/112061-RaccomandazioniGdS-MM-cTN_2018.pdf) e sottoposto a validazione esterna del GdS EBLM SIPMeL e della Commissione Qualità SIPMeL, che hanno fornito alcune osservazioni critiche. Il punto di vista degli utilizzatori clinici è stato espresso dai componenti del GdS appartenenti alle discipline di Cardiologia (MC) e Medicina d'Urgenza (AG) e quello degli utilizzatori di Laboratorio dagli altri componenti che rappresentano le professionalità costituenti l'equipe di Laboratorio (MD, DSLB, TSLB). La versione qui presentata, anche sulla base delle osservazioni raccolte, è stata definita con il metodo Delphi modificato (scambio di e-mail, confronto diretto) tra i componenti del GdS MM.

Raccomandazioni per la prevenzione e correzione di FP/FN di cTn

1. Si raccomanda una perfetta conoscenza del proprio metodo/strumento, in particolare per quanto attiene la sua *robustness* (% attesa di *outlier*), la matrice suggerita dal produttore e la sensibilità analitica, al fine di prevenire le possibili interferenze. CLASSE I; LIVELLO DI EVIDENZA B.

Le principali "evidenze" che sottolineano l'importanza della strumentazione,^{23, 31, 32} della matrice^{10, 22-25, 33} e del metodo^{25, 32} per la prevenzione dei FP/FN contengono le recenti Raccomandazioni ufficiali²⁵ di *Academy of the American Association for Clinical Chemistry* e *Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* e quindi possono essere classificate di livello B.

2. Si raccomanda la scrupolosa osservanza delle regole di calibrazione e ri-calibrazione (lotto-lotto), dell'uso di CQI e VEQ e delle caratteristiche della manutenzione per minimizzare la variabilità analitica e gli *outlier*. CLASSE I; LIVELLO DI EVIDENZA B.

L'effetto di queste basilari regole di buona pratica di laboratorio sui FP/FN è sottovalutato ma fondamentale per "flyers" e per discrepanze tra punti curva.²³ Le principali "evidenze" che sottolineano l'importanza della calibrazione, del controllo di qualità interno (a più livelli e vicino ai valori del 99° percentile e del *limit of detection* - LoD) ed esterno e di una attenta manutenzione per la prevenzione dei FP/FN si riferiscono alle recenti raccomandazioni ufficiali²⁵ di *Academy of the American Association for Clinical Chemistry* e *Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* e quindi

possono essere classificate di livello B. Per quanto riguarda la frequenza della calibrazione, i fattori principali di cui tenere conto sono l'imprecisione analitica del metodo in uso e le caratteristiche della curva di calibrazione.³⁴

3. Si raccomanda di seguire le linee guida per l'accettabilità dei campioni, in particolare per emolisi e fibrina. CLASSE I; LIVELLO DI EVIDENZA B.

La qualità e integrità del campione è uno dei primi comandamenti per risultati analitici certi e interpretazioni diagnostiche efficaci e una sistematica valutazione della qualità del campione per la determinazione di cTn è fortemente raccomandata.¹⁰ I riferimenti bibliografici comprendono linee guida nazionali ed europee,³⁵⁻³⁷ alle quali si rimanda, e quindi possono essere classificati di livello B.

4. Nella valutazione dei valori di cTn tenere conto delle caratteristiche del soggetto (età, genere, attività fisica, ritmo circadiano), della variabilità biologica (in particolare per la stima di *reference change value* (RCV) e delle caratteristiche analitiche del metodo/strumento utilizzato. CLASSE IIa; LIVELLO DI EVIDENZA B.

I due punti iniziali per la valutazione di un dato di cTn sono da un lato le caratteristiche analitiche del metodo del Laboratorio (LAB),^{25, 33, 38} in particolare rispetto alla variabilità di risultati tra cTnT e cTnI²⁴ e tra i diversi metodi di cTnI,^{24, 38} e dei metodi POCT tra di loro e con il LAB,³⁹ e dall'altro quelle del soggetto,^{7, 25, 38} in particolare per l'attività fisica.⁷ I riferimenti contengono le recenti Raccomandazioni ufficiali²⁵ di *Academy of the American Association for Clinical Chemistry* e *Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* e quindi possono essere classificate di livello B. Il GdS sottolinea l'importanza di considerare le condizioni basali del soggetto e l'impatto della variabilità biologica, a suo avviso poco considerati nella pratica clinica.

5. Valutare il risultato in riferimento al motivo della richiesta (sospetta SCA; prova di danno miocardico; valutazione prognostica di soggetto critico; ecc.). Il dato va sempre interpretato nella serie. Escludere patologie cardio-vascolari che possano sostenere un risultato positivo di cTn. Escludere patologie non cardio-vascolari in cui è noto esservi aumenti di cTn (es. malattie renali). Solo dopo (da un punto di vista logico; può essere concomitante da un punto di vista pratico) questa attenta analisi clinica, pensare ad un FP/FN pre-analitico e/o analitico. CLASSE IIa; LIVELLO DI EVIDENZA C.

Il dato troponinico deve essere inserito nel sospetto clinico, di solito SCA, ma anche di prova di danno miocardico non ischemico. Tale indicazione è patrimonio clinico

consolidato, almeno in letteratura,⁷ ed è ben descritto dagli autori che si occupano di FP/FN di cTn dal versante clinico,^{10, 24} cui si rimanda.

6. La gestione della ricerca dell'interferente va eseguita in sinergia con il clinico, sia perché il quadro clinico può indirizzare il sospetto (anche nelle situazioni molto rare come supplementazione di biotina), sia perché vanno evitate interpretazioni fuorvianti. CLASSE I; LIVELLO DI EVIDENZA B.

La soluzione dei FP/FN di cTn di più alto impatto clinico passa senza dubbio attraverso un'analisi condivisa dei possibili fattori del paziente (malattie, terapia) conosciuti solo dal clinico, dei fattori preanalitici condivisi tra percorso extra e intra laboratorio e dei fattori analitici conosciuti solo dal Laboratorio. La qualità dei rapporti clinica-laboratorio determina largamente il risultato di risoluzione del problema.^{7, 10, 23, 25} Alan Jaffe nel secondo comandamento invita esplicitamente i clinici a chiedere al Laboratorio lumi sulla soluzioni dei sospetti falsi risultati di cTn.⁷

7. Nel sospetto di FP/FN pre-analitico e/o analitico, si raccomanda di ripetere il dosaggio su un nuovo campione, con attenzione alla fase pre-analitica (prelievo) e dopo verifica dello stato analitico del metodo/strumento. La ri-centrifugazione può essere un'opzione veloce, purché si sia certi che non induca mis-classificazioni. Se possibile, si suggerisce di determinare la cTn con un altro metodo (T/I o diverso metodo I), non con metodi POCT. CLASSE I; LIVELLO DI EVIDENZA C.

L'utilizzo di un nuovo campione è la scelta preferenziale, se accompagnata da raccomandazioni di una corretta fase preanalitica.^{10, 24} Tuttavia, la ri-centrifugazione è un metodo comunemente utilizzato perché pratico (si esperisce sul campione a disposizione), veloce (la tempestività della risposta di cTn è critica per i pazienti con sospetta SCA e non solo) e risolve le interferenze da fibrina (che sono tra le interferenze più frequenti secondo la letteratura). Secondo alcuni autori, andrebbe operata di routine per scoprire i possibili FP di cTn.⁴⁰ Essa, però, può indurre mis-classificazione di pazienti⁴¹ e quindi vi sono delle note di cautela sul suo utilizzo indiscriminato.⁴² Poiché da alcuni esperimenti condotti dal GdS MM^{43, 44} sembra che questo fenomeno sia presente con le cTn contemporanee e non con i metodi ad alta sensibilità, si raccomanda di verificare l'effetto della ri-centrifugazione sul metodo in uso.

8. Se si tratta di un sospetto FP, eliminate le cause preanalitiche (matrice, fibrina, emolisi, ecc.), si raccomanda di utilizzare, in sequenza, prove di diluizione, prove con bloccanti per eterofili (HBR/HBT) e prove di *mixing* con sieri animali per testimoniare l'interferenza da anticorpi

eterofili (HA) e anticorpi umani anti-murini (HAMA). In caso di negatività delle prove precedenti, si raccomanda la ricerca del fattore reumatoide e di utilizzare precipitanti come PEG 8000/6000 o ultracentrifugazione per evidenziare macrotroponina. Se possibile, si suggerisce di testimoniare la specie molecolare con cromatografia per gel filtrazione. CLASSE IIa; LIVELLO DI EVIDENZA C.

I FP sono l'evenienza prevalente, sia in letteratura¹ sia nell'esperienza giornaliera,² perché rilevanti per l'impatto sul percorso clinico e perché i FN da autoanticorpi anti-cTn sono una scoperta piuttosto recente. La loro indagine deve seguire una logica derivante dalla prevalenza e dal metodo di cTn utilizzato.^{10, 24} Tra i FP, la causa più comune sono HA/HAMA,⁴⁵ anche in era di hs-cTn,² nonostante tutti i Produttori abbiano inserito nel disegno dei metodi molecole chimiche (PEG) o immunoglobuliniche per minimizzare il loro effetto.²⁴ Il fattore reumatoide non appare essere una causa principale e di solito si accompagna ad HA, tuttavia va ricercato se HA/HAMA non sono la causa dimostrabile.⁴⁶ La macrotroponina è un'evenienza rara, segnalata per la cTnI Abbott (Roma, Italia) anche ad alta sensibilità, cui pensare se le altre cause sono state eliminate.⁴⁷ Questa interferenza andrebbe studiata identificando la specie molecolare.⁴⁷ Pur nella grande messe di dati, in particolare per l'interferenza di HA, non esistono linee guida o studi sistematici che consentano di classificare di livello B le evidenze a sostegno di questa Raccomandazione.

9. In caso di sospetto FN, eliminate le cause preanalitiche (matrice, fibrina, emolisi, ecc.) si raccomandano prove di *mixing* con sieri umani per testimoniare la presenza di autoanticorpi anti-cTn. Quando possibile, si suggerisce di testimoniare il tipo di epitopo coinvolto. CLASSE IIa; LIVELLO DI EVIDENZA C.

I FN sono meno percepiti sia in letteratura¹ sia nella pratica di laboratorio² e, di solito vengono riferiti a comuni cause preanalitiche.^{10, 23, 24} Tuttavia, esclusi questi interferenti, si deve pensare agli autoanticorpi anti-cTn^{10, 24} che appaiono una causa emergente in relazione ad insulti cardiovascolari in condizioni di indurre la loro produzione.⁴⁸⁻⁵⁰ Le prove di *mixing* con sieri umani mostrano la loro presenza e studi molecolari consentono di precisarne le caratteristiche immunologiche.⁵⁰

10. Tutti i casi FP/FN, anche di lieve entità, vanno ricercati e registrati per un'opportuna misura della loro prevalenza e per testimonianza delle azioni correttive. Devono essere comunicati in modo formale al fornitore del sistema diagnostico e alla comunità scientifica. CLASSE IIb; LIVELLO DI EVIDENZA C.

La necessità della registrazione dei casi FP/FN è rite-

nuta importante dal GdS MM, in relazione all'incertezza intorno alla reale incidenza^{2, 25, 45} del problema e alle misure raccomandate e messe in atto.^{2, 10, 24} Tuttavia non vi sono se non scarse indicazioni in letteratura rispetto a tale raccomandazione. Il rapporto con i produttori è raccomandato, in generale, nella politica di minimizzazione del rischio di errori analitici da interferenze nei metodi immunometrici.⁵¹

Discussione e conclusioni

In letteratura si trovano poche indicazioni sulla prevenzione dei FP/FN: dopo la revisione di Lum *et al.*²² sulle interferenze sui metodi di cTn, Herman *et al.*²³ hanno presentato una pregevole sintesi generale delle cause di variabilità ed errore nella determinazione di (hs)-cTn, distinte per la fase preanalitica, analitica e postanalitica, dalla quale sono desumibili alcune regole per la prevenzione delle interferenze da strumento/metodo, rafforzata dalle raccomandazioni di Wu *et al.*²⁵

Le prime tre raccomandazioni del GdS MM (raccomandazioni 1-3) sintetizzano e mettono in ordine le misure preventive nei confronti di FP/FN strumentali a carico del Laboratorio.

Esistono anche pochi suggerimenti di algoritmi per la soluzione del sospetto FP/FN di cTn, una volta presentatosi. Vafajie *et al.*¹⁰ suggeriscono i seguenti passaggi sequenziali per confermare un sospetto FP clinico: ripetere il prelievo per valutare la conferma del dato non congruente con l'ipotesi clinica ed eliminare il possibile effetto dell'emolisi; escludere patologie non SCA con test clinici (ecografia) e di laboratorio (?); prendere quindi in considerazione un FP analitico: altro metodo di cTn, verifica di HA, controllo dello strumento (malfunzionamento), controllo del campione (fibrina, micro-particelle), inviare a laboratori di riferimento e/o al produttore; infine, escludere patologie cardiache con test clinici più sensibili (risonanza magnetica cardiaca, angiografia coronarica, TAC, biopsia miocardica). Gli autori considerano solo i FP e non i FN (l'emolisi espressamente citata come interferente più frequente può dare anche FN!), affidano al Laboratorio una sequenza di interventi che non segue una logica laboratoristica e non distinguono misure preventive e risolutive. Concludono, però, con la raccomandazione di una valutazione interdisciplinare, derivante da un colloquio tra il clinico e il suo laboratorio, per risolvere tempestivamente il dubbio e minimizzare i rischi connessi. Mair *et al.*²⁴ affrontano il problema da un punto di vista totalmente clinico: in presenza di un sospetto FP analitico, rideterminare hs-cTn per ricercare un cambiamento di valori >20% che attesta un

danno miocardico, da confermare con metodi di *imaging* per un corretto *rule in/rule out*; se non vi è il delta del 20%, testare se possibile con un diverso metodo di hs-cTn e se si attesta la presenza di differenti risultati contattare il Laboratorio per indagare sull'interferenza analitica; viceversa se il dato è confermato pensare a un danno miocardico cronico da confermare con *imaging*. Se non è disponibile un secondo metodo hs-cTn, cercare la conferma di un'ipotesi operativa di danno miocardico cronico da CAD (*coronary artery disease*) o da malattia cardiaca strutturale con *imaging* e, se non confermata, escludere interferenze analitiche. Gli autori hanno ben presente che il cosiddetto FP di cTn è raramente un'interferenza analitica e più comunemente un FP clinico rispetto all'ipotesi di SCA, ma rispetto al ruolo del Laboratorio non distinguono misure preventive e risolutive e non suggeriscono una sequenza logica di interventi.

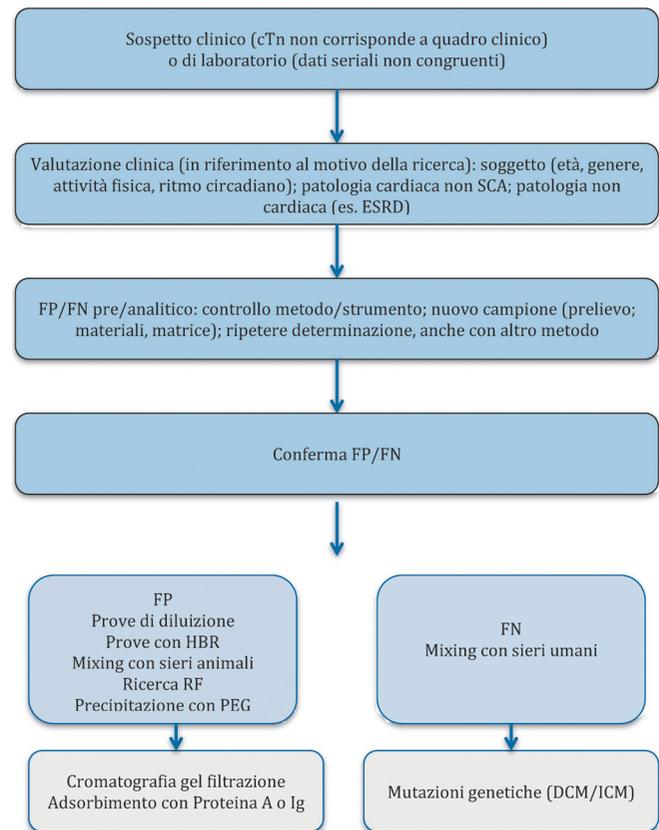


Figura 1.—Schema d'azione per la risoluzione di sospetti FP e FN di cTn. FP: falsi positivi; FN: falsi negativi; SCA: Sindrome Coronarica Acuta; ESRD: end-stage renal disease; HBR: heterophilic blocking agents; RF: fattore reumatoide; PEG: glicole polietilenico; DCM: miocardiopatia dilatativa cronica; ICM: miocardiopatia ischemica.

Le seconde tre raccomandazioni del GdS MM (raccomandazioni 4-6) sono finalizzate ad offrire una sequenza logica al clinico nel caso di sospetto FP/FN di cTn e a sottolineare l'esigenza della collaborazione clinico-laboratorio.

Le raccomandazioni 7-9 del GdS MM, che sintetizzano molti spunti sparsi di letteratura e le convinzioni del Gruppo, cercano di suggerire i percorsi logici che il Laboratorio dovrebbe seguire per la soluzione del sospetto FP/FN analitico, proponendo misure generali di verifica della fase preanalitica e quindi delle interferenze derivanti dal campione, lungo sequenze ragionate sulla base dell'incidenza dell'interferenza e dei successivi livelli di approfondimento, per FP e FN separatamente. Il percorso clinico-laboratoristico di risoluzione di un sospetto FP/FN di cTn è illustrato in forma di *flow-chart* in Figura 1, dove è evidente che il sospetto nasce sia a livello clinico sia a livello di Laboratorio, si sviluppa in un colloquio interdisciplinare e trova soluzione definitiva nelle sequenze laboratoristiche di approfondimento e accertamento dell'interferente.

Infine, la raccomandazione 10 insiste sulla raccolta dei dati a fini di qualità del singolo Laboratorio e di costruzione di "evidenze" scientifiche ben strutturate e sul coinvolgimento dei produttori, sia per l'individuazione finale della possibile interferenza sia per l'eventuale stimolo al miglioramento del disegno del metodo. Quest'ultimo passaggio rappresenta bene uno dei compiti misconosciuti del Laboratorio (il miglioramento delle performance metodo/strumento) e l'insieme delle raccomandazioni, al di là dell'utilità specifica che ci auguriamo possano avere nel lavoro quotidiano, mostra il ruolo essenziale del lavoro all'interfaccia clinica-laboratorio nelle fasi pre-pre e post-post analitiche del *Total Testing Process*.⁵²

Bibliografia

- 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;15:000-000.
- Veneziani F, Galli GA, Malloggi L, Moretti M, Morandini M, Manno M, 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 II: dati e riflessioni dalla IV indagine del GdS MM SIPMeL. *Riv Ital Med Lab* 2019;15:000-000.
- Katrukha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 2013;78:1447-65.
- Apple FS. The specificity of biochemical markers of cardiac damage: a problem solved. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1085-9.
- Chung JZ, Dallas Jones GR. Effect of renal function on serum cardiac troponin T—population and individual effects. *Clin Biochem* 2015;48:807-10.
- Mingels AM, Cardinaels EP, Broers NJ, van Sleetuwen A, Streng AS, van Dieijen-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.
- Jaffe AS. The 10 commandments of troponin, with special reference to high sensitivity assays. *Heart* 2011;97:940-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- Wens SC, Schaaf GJ, Michels M, Kruijshaar ME, van Gestel TJ, In 't Groen S, et al. Elevated plasma cardiac troponin T levels caused by skeletal muscle damage in Pompe disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2016;9:6-13.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al.; ESC Scientific Document Group. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J* 2019;40:237-69.
- Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, Antman EM. The search for a biomarker of cardiac ischemia. *Clin Chem* 2003;49:537-9.
- 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.
- Apple FS, Sandoval Y, Jaffe AS, Ordóñez-Llanos J; IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. Cardiac troponin assays: guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care. *Clin Chem* 2017;63:73-81.
- Apple FS, Collinson PO; IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem* 2012;58:54-61.
- 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.
- Tate JR, Bunk DM, Christenson RH, Katrukha A, Noble JE, Porter RA, et al.; IFCC Working Group on Standardization of Troponin I. Standardisation of cardiac troponin I measurement: past and present. *Pathology* 2010;42:402-8.
- Tate JR, Bunk DM, Christenson RH, Barth JH, Katrukha A, Noble JE, et al.; IFCC Working Group on Standardization of Cardiac Troponin I. Evaluation of standardization capability of current cardiac troponin I assays by a correlation study: results of an IFCC pilot project. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:677-90.
- IFCC. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Standardisation of Troponin I (WG-TNI) [Internet]. Disponibile alla pagina: <http://www.ifcc.org/ifcc-scientific-division/sd-working-groups/wg-tni/> [citato 14 febbraio 2019].
- 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.
- Lum G, Solarz DE, Farney L. False Positive Cardiac Troponin Results in Patients Without Acute Myocardial Infarction. *LABMEDICINE* 2006;37:546-50.
- 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.

24. 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.
25. 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.
26. Veneziani F, Manno M, Malloggi L, Moretti M, Morandini M, Galli GA, *et al.* Il problema dei falsi positivi e falsi negativi di troponina. Parte III: il ruolo dell'industria biomedica. *Riv Ital Med Lab* 2019;15:000–000.
27. Standard Operating Procedures for: Preparing, Publishing and Revising National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines. [Internet]. Disponibile alla pagina: https://2019aacc.org/-/media/Files/AACC-Academy/NACB/Newsletters/NACB_LMPG_SOP_Jan_2014.pdf?la=en&hash=7C1CABE9804031724D290CA7BC21BBCC1D179599 [citato 14 febbraio 2019].
28. US Preventive Services Task Force. Homepage [Internet]. Disponibile alla pagina: <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/> [citato 14 febbraio 2019].
29. Cappelletti P, Morandini M, Moretti M, Malloggi L, Stenner E, Rubin D, *et al.* Raccomandazioni del Gruppo di Studio sui marcatori miocardici (GdS MM) di SIPMeL per l'implementazione di *Point-of-care testing* (POCT) per la determinazione della troponina (cTn). *Riv Ital Med Lab* 2016;12:36–48.
30. Jacobs AK, Kushner FG, Ettinger SM, Guyton RA, Anderson JL, Ohman EM, *et al.* ACCF/AHA clinical practice guideline methodology summit report: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2013;127:268–310.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Panteghini M. How clinical laboratories may improve their performance: the “high sensitivity” troponin paradigm. *Clin Chem* 2018;64:621–3.
35. 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.
36. Lippi G, Cadamuro J, von Meyer A, Simundic AM; European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE). Practical recommendations for managing hemolyzed samples in clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:718–27.
37. Lippi G, von Meyer A, Cadamuro J, Simundic AM. Blood sample quality. *Diagnosis (Berl)* 2019;6:25–31.
38. Wu AH. Biological and analytical variation of clinical biomarker testing: implications for biomarker-guided therapy. *Curr Heart Fail Rep* 2013;10:434–40.
39. Morandini M, Manno M, Moretti M, Malloggi L, Veneziani F, Burgio MA, *et al.* a nome del GdS MM SIPMeL. Point-of-care testing (POCT) per marcatori cardiaci in Italia. Dati e valutazioni dalla IV indagine del GdS MM SIPMeL. *Riv Ital Med Lab* 2018;14:149–55.
40. Li Y, Wang X, Xu L, Wen X. Rapid identification of falsely elevated serum cardiac troponin I values in a stat laboratory. *Lab Med* 2014;45:82–5.
41. Canovi S, Campioli D, Marcheselli L. Specimen recentrifugation and elevated troponin I levels. *Lab Med* 2015;46:47–50.
42. Pfäfflin A. Doubt on prevention of false-positive results of cardiac troponin I by recentrifugation. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:892–3.
43. 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/it/soci/documenti/112262> [citato 14 febbraio 2019].
44. 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/it/soci/documenti/112262> [citato 14 febbraio 2019].
45. Lippi G, Aloe R, Meschi T, Borghi L, Cervellini G. Interference from heterophilic antibodies in troponin testing. Case report and systematic review of the literature. *Clin Chim Acta* 2013;426:79–84.
46. Onuska KD, Hill SA. Effect of rheumatoid factor on cardiac troponin I measurement using two commercial measurement systems. *Clin Chem* 2000;46:307–8.
47. Warner JV, Marshall GA. High incidence of macrotroponin I with a high-sensitivity troponin I assay. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1821–9.
48. 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.
49. Adamczyk M, Brashear RJ, Mattingly PG. Prevalence of auto-antibodies to cardiac troponin T in healthy blood donors. *Clin Chem* 2009;55:1592–3.
50. O'Donohoe TJ, Ketheesan N, Schrale RG. Anti-troponin antibodies following myocardial infarction. *J Cardiol* 2017;69:38–45.
51. Sturgeon CM, Viljoen A. Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk. *Ann Clin Biochem* 2011;48:418–32.
52. Cappelletti P. Brain-to-brain loop 2020: è ancora utile il ciclo di Lundberg? *Riv Ital Med Lab* 2017;13:127–33.

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

Studi condotti su esseri umani e animali.—Per questo tipo di studio non è richiesto l'inserimento di alcuna dichiarazione relativa agli studi effettuati su esseri umani e animali.

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

Pubblicato online: 1 luglio 2019. - Accettato: 20 marzo 2019. - Ricevuto: 14 febbraio 2019.