

I protocolli biochimici per la diagnostica cardiaca nell'era delle troponine: verifica dell'utilizzo di alcune mappe di cura ad un anno dalla loro introduzione*

Mauro Panteghini¹, Franca Pagani¹, Graziella Bonetti¹, Claudio Cuccia²

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Spedali Civili

²Divisione di Cardiologia, Spedali Civili e Cattedra di Cardiologia, Università, Brescia

ABSTRACT

Cardiac biochemical algorithms in the troponin era: audit of some care maps one year after their introduction

Previously in this journal, we described the development and the implementation of new biochemical strategies for diagnosing and monitoring patients with acute coronary syndrome in our clinical practice. The main goals of these care maps, containing the definition of the optimal sequence of acts and interventions, were the delay reduction and the elimination of unjustifiable differences in the diagnostic approach and management of these patients. After one year from their introduction, we report here the audit's findings. Our experience show that the collaboration and cooperation between those with expertise in cardiology, laboratory medicine, and quality improvement, working inside the hospital, may permit to achieve the goals reported above, through a continuous improvement of the processes and the introduction of changes directed to further improve the obtained results as well.

RIASSUNTO

In un precedente contributo su questa rivista, abbiamo descritto l'esperienza di sviluppo di nuove strategie biochimiche per la diagnosi ed il monitoraggio di pazienti con sospetta sindrome coronarica acuta nella nostra realtà ospedaliera. Il principale obiettivo della elaborazione di tali "mappe di cura", contenenti la definizione della sequenza ottimale delle operatività e della temporalizzazione degli interventi, era la riduzione di eventuali ritardi nel servizio offerto e la eliminazione di possibili ingiustificabili differenze negli approcci diagnostici e di trattamento da paziente a paziente. A distanza di un anno dalla loro introduzione, riportiamo qui i dati relativi alla verifica del loro utilizzo pratico. La nostra esperienza dimostra che la collaborazione e cooperazione fra soggetti con differenti competenze e ruoli all'interno dell'organizzazione ospedaliera può consentire di raggiungere gli obiettivi soprariportati, permettendo anche un continuo miglioramento dei processi elaborati, con l'eventuale introduzione di cambiamenti atti ad ulteriormente migliorare i risultati ottenuti.

INTRODUZIONE

In un precedente contributo su questa rivista, abbiamo descritto l'esperienza di sviluppo di nuove strategie biochimiche per la diagnosi ed il monitoraggio di pazienti con sospetta sindrome coronarica acuta (SCA) nella nostra realtà ospedaliera (1). Il principale obiettivo della elaborazione di tali "mappe di cura", contenenti la definizione della sequenza ottimale delle operatività e della temporalizzazione degli interventi, era la riduzione di eventuali ritardi nel servizio offerto e la eliminazione di possibili ingiustificabili differenze negli approcci diagnostici e di trattamento da paziente a paziente. Ora, a distanza di un anno dalla loro introduzione, riportiamo i dati relativi alla prima verifica

del loro utilizzo pratico.

I PROTOCOLLI DIAGNOSTICI

Tre protocolli biochimici sono stati implementati per le principali problematiche riscontrabili nei pazienti ricoverati in Unità di Terapia Intensiva Coronarica (UTIC) (1). Un primo protocollo ('verde') è stato elaborato per rispondere al problema diagnostico di sospetto infarto acuto del miocardio (IMA) ("rule in/rule out") in pazienti ricoverati in UTIC con elettrocardiogramma non significativo. Esso si basa sull'utilizzo del marcatore più cardiospecifico attualmente disponibile, la troponina I cardiaca (cTnI), determi-

*Il presente lavoro riassume il contenuto e alcuni risultati del progetto "Mappe di cura per la diagnostica biochimica cardiaca" inserito tra gli obiettivi per l'anno 2000 dell'U.O. Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1 e dell'U.O. Cardiologia Spedali Civili [Obiettivo generale (piano strategico aziendale): miglioramento della qualità tecnica delle prestazioni erogate mediante lo sviluppo di linee guida e protocolli diagnostico-terapeutici].

nato per tre volte dall'ammissione in UTIC fino a 12 ore dopo, mediante metodo Access (Beckman Coulter) (2). Per l'interpretazione dei risultati, e' sembrato opportuno proporre l'individuazione di due livelli decisionali: uno, pari al limite superiore di riferimento per il metodo ($0.03 \mu\text{g/L}$), per identificare la presenza di "danno miocardico" ed un secondo, piu' elevato ($0.15 \mu\text{g/L}$), per porre la diagnosi di IMA (3).

Il secondo protocollo ('bianco') e' stato elaborato nell'ottica di una migliore valutazione del paziente con segni elettrocardiografici di SCA, ma non di chiara necrosi in atto. In questo caso, l'impiego del marcatore biochimico e' principalmente orientato alla stratificazione del rischio del paziente di andare incontro nel breve-medio termine ad eventi cardiaci maggiori (morte e/o IMA). A tal fine, e' stata impiegata la determinazione della troponina T cardiaca (cTnT) mediante analizzatore Elecsys 2010 (Roche Diagnostics), parametro indubbiamente piu' studiato per questo tipo di applicazione oltre che dotato di una migliore precisione alle concentrazioni piu' basse (4). Tempi di prelievo e criteri interpretativi (due cutoff decisionali: $0.02 \mu\text{g/L}$ e $0.20 \mu\text{g/L}$) sono simili a quelli riportati per il protocollo 'verde'.

L'ultimo protocollo ('rosso') e' stato elaborato per la stratificazione del rischio ed il monitoraggio dei pazienti nei quali l'IMA sia gia' stato diagnosticato e la terapia riperfusa, in assenza di controindicazioni, effettuata. Non e' quindi un protocollo strettamente diagnostico, ma utilizzando la CK-MB, determinata in concentrazione di massa su analizzatore Elecsys, punta a valutare l'estensione della necrosi attraverso il suo picco enzimatico, un eventuale reinfarto e, indirettamente, l'efficacia della terapia riperfusa attraverso la velocita' di aumento dell'enzima nel plasma ("slope"). A tal fine, sono stati proposti prelievi ogni 6 ore per le prime 72 ore di ricovero. In questo protocollo e' stata introdotta, in via sperimentale, anche la determinazione della cTnT sul prelievo all'ammissione in UTIC sulla base del possibile valore di questa misurazione nel predire il rischio di successivi eventi in questo tipo di pazienti (5).

In fase di refertazione, il Medico di Laboratorio, in base anche alla sua particolare conoscenza delle problematiche analitiche, rivede e commenta i dati ottenuti, attraverso l'utilizzo di un referto grafico cumulativo e di una serie di commenti precodificati, differenziati per tipologia di protocollo (1).

RISULTATI

Aspetti quantitativi

Nel periodo monitorato (novembre 1998 - novembre 1999) sono stati eseguiti complessivamente 1243 protocolli, dei quali il 42% per la diagnosi di sospetto IMA, il 41% per il monitoraggio di IMA gia' diagnosticato ed il 17% per la stratificazione del rischio del paziente. Considerando che la nostra UTIC, dotata di 12 posti-letto, ha effettuato nel corso del 1999 circa 1400 ricoveri, se ne deduce che le mappe di cura proposte sono state utilizzate in circa il 75% dei pazienti ricoverati [tenendo presente che 188

pazienti (pari al 13.4% dei ricoveri) sono stati sottoposti a due diversi protocolli, prima a quello diagnostico ('verde' o 'bianco') e poi a quello di monitoraggio]. Se il primo dei problemi pratici, che si presentano quando si propongono nuove strategie operative, e' l'implementazione del loro utilizzo (6), si puo' affermare che nel nostro caso tale obiettivo e' stato pienamente raggiunto. A conferma dell'ottimo recepimento delle indicazioni operative proposte sta anche il basso numero di protocolli diagnostici interrotti (6.0% dei protocolli 'verdi' e 6.5% dei protocolli 'bianchi'), cosa invece discretamente frequente (62.5% dei casi) per il protocollo 'rosso' di monitoraggio dell'IMA. Quest'ultimo dato, associato alla bassa frequenza di reinfarti (3.1%) rilevata nei primi tre giorni dopo il ricovero, ci ha portato ad introdurre il primo correttivo, riducendo il periodo standard di monitoraggio biochimico di un IMA mediante il dosaggio della CK-MB da 72 a 48 ore, con riduzione di 4 prelievi e passaggio da 13 a 9 determinazioni per caso. Tale modifica portera' tra l'altro ad un risparmio calcolato di costo-reagenti di circa 3.800.000 lire/anno. Si e' naturalmente deciso di lasciare aperta la possibilita' di proseguire il monitoraggio di particolari pazienti oltre le 48 ore dal ricovero ma tale opzione dovra' essere motivata per iscritto dal Cardiologo richiedente.

Il protocollo per la diagnosi biochimica di sospetto infarto

La Fig. I mostra i risultati relativi all'impiego del protocollo per la diagnosi biochimica di sospetto IMA. Su un totale di 504 pazienti esaminati, il 38.7% era diagnosticato come IMA (almeno un valore di cTnI $>0.15 \mu\text{g/L}$) mentre nel 34.9% dei casi l'IMA era escluso (tutti i valori di cTnI $\leq 0.03 \mu\text{g/L}$). Poco piu' del 5% dei pazienti mostravano un quadro biochimico di "danno miocardico" mentre in circa il 12% il dato fornito da questo protocollo rimaneva dubbio, nel senso che lievi aumenti della concentrazione di cTnI al di sopra del limite superiore di riferimento, solitamente nell'intervallo compreso tra 0.03 e $0.07 \mu\text{g/L}$, non venivano poi confermati o alla ripetizione del dosaggio sullo stesso campione o alla valutazione di un campione successivo appartenente allo stesso protocollo, non consentendo pero' di eliminare completamente il dubbio di un possibile 'screzio' miocardico.

Il protocollo per la stratificazione del rischio

La Fig. II mostra i dati relativi al protocollo per la stratificazione biochimica del rischio nei pazienti con sospetta SCA. 16.7% dei pazienti mostravano dati compatibili con la presenza di "danno miocardico" (cTnT persistentemente $>0.02 \mu\text{g/L}$), mentre in poco meno della meta' dei casi tale danno poteva essere chiaramente escluso (tutti i valori di cTnT $\leq 0.02 \mu\text{g/L}$). Inoltre, 28.4% dei pazienti sospettati di avere SCA mostravano in realta' aumenti di cTnT al di sopra del cutoff decisionale per IMA ($0.20 \mu\text{g/L}$). Interessante notare che piu' di due/terzi di questi ultimi erano passati al monitoraggio con CK-MB, che solo in tre

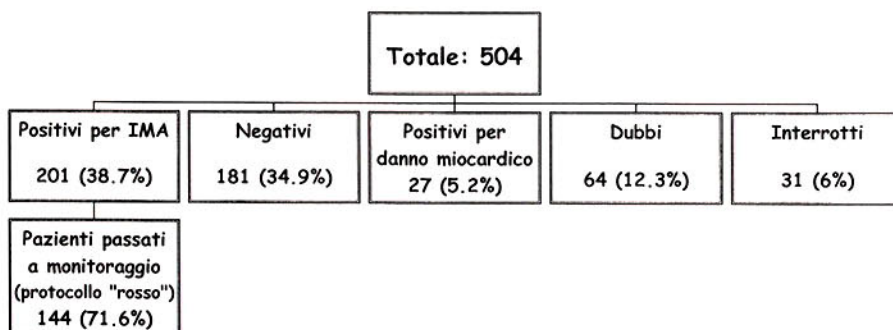


Figura I

Dati relativi all'utilizzo del protocollo per la diagnosi biochimica di sospetto infarto acuto del miocardio (IMA): protocollo "verde", periodo novembre 1998 - novembre 1999

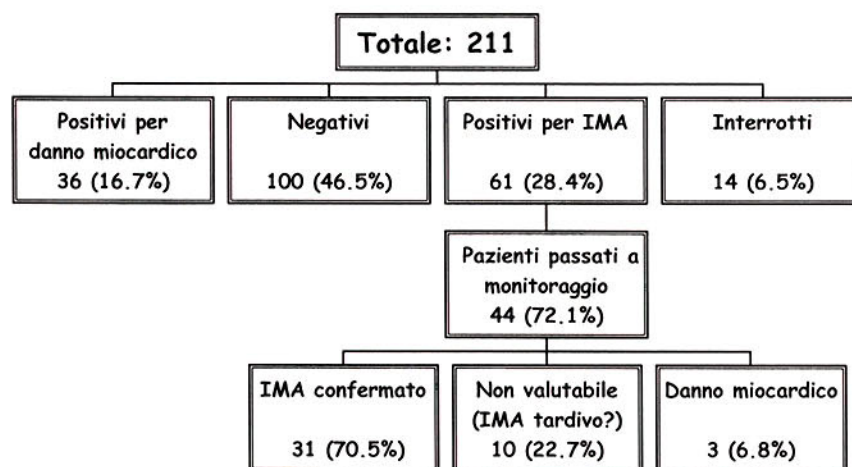


Figura II

Dati relativi all'utilizzo del protocollo per la stratificazione biochimica del rischio nella sindrome coronarica acuta: protocollo "bianco", periodo novembre 1998 - novembre 1999
IMA = infarto acuto del miocardio

pazienti mostrava un picco plasmatico ≤ 2 volte il limite superiore di riferimento ($12 \mu\text{g/L}$), riclassificando quindi questi pazienti come aventi "danno miocardico" e non infarto. Nella stragrande maggioranza dei casi, la diagnosi di IMA era confermata dal picco di CK-MB, a testimonianza della validità della scelta fatta di utilizzare per la cTnT un cutoff decisionale di $0.20 \mu\text{g/L}$ come "surrogato" al criterio biochimico tradizionale per la diagnosi di IMA (CK-MB ≥ 2 volte il limite superiore di riferimento).

L'importanza dell'imprecisione analitica nell'impiego pratico del dosaggio delle troponine cardiache

Ci siamo comunque chiesti, dopo un anno di impiego routinario di entrambi i protocolli utilizzando due diverse troponine, la cTnI per la diagnosi di IMA e la cTnT per la stratificazione del rischio, se non fosse in pratica possibile un approccio biochimico unificato che impiegasse il dosaggio della cTnI su analizzatore Access per entrambi i protocolli. Cio' doveva naturalmente avvenire attraverso la

valutazione dell'attendibilità dei risultati di tale strumento in quella che il produttore identifica come "zona grigia" di concentrazione (compresa tra 0.03 e $0.10 \mu\text{g/L}$). Si è quindi proceduto ad un'esperienza pilota, selezionando 39 pazienti tra quelli consecutivamente ammessi in UTIC con il sospetto di IMA, che mostravano almeno un valore di Access cTnI in questo intervallo di concentrazione senza tuttavia mai superare la soglia di $0.10 \mu\text{g/L}$ durante il periodo di ospedalizzazione. I risultati ottenuti con Access sui campioni di questi pazienti erano comparati a quelli ottenuti con due metodi alternativi (Elecys cTnT e Bayer ACS:180 cTnI), entrambi dotati di elevata precisione a basse concentrazioni di troponina (7,8). Utilizzando come livello decisionale per tutti e tre i metodi il rispettivo limite superiore di riferimento ($0.03 \mu\text{g/L}$ per Access, $0.02 \mu\text{g/L}$ per Elecys e $0.20 \mu\text{g/L}$ per ACS), ottenuto in nostre precedenti esperienze secondo i dettami suggeriti dal Comitato sui Marcatori Cardiaci dell'IFCC (9), la frequenza di positivi (= pazienti con diagnosi biochimica di "danno miocardico") era naturalmente del 100% [95% intervallo di confidenza (IC) per $n = 39$: 91-100%] per l'Access (essen-

do il valore $>0.03 \mu\text{g/L}$ il criterio di selezione), del 72% (95% IC: 55-85%) per l'Elecsys e del 59% (95% IC: 42-74%) per l'ACS, con una elevata significatività statistica ($P \leq 0.001$) nella differenza tra la minor frequenza di positivi ottenuti con questi ultimi e l'Access. Le possibili ipotesi interpretative erano due: a. l'Access cTnI è significativamente più sensibile degli altri due metodi nel rilevare la presenza di un rilascio del marcatore, e quindi del danno miocardico, b. i risultati ottenuti con i diversi metodi in quest'ambito di concentrazioni sono tra loro scarsamente correlabili per varie problematiche, quali diversità della molecola rilevata (cTnI vs cTnT), una diversa imprecisione, problemi di reattività anticorpale, ecc. (10).

La Fig. III mostra in particolare il confronto tra i risultati ottenuti con i due metodi per la determinazione della cTnI con l'Elecsys cTnT, da noi considerato come l'attuale riferimento biochimico per la rilevazione della presenza di "danno miocardico" per due motivi principali: uno di ordine scientifico [un maggior numero di studi di validazione è stato eseguito utilizzando questo marcatore (11)] e uno di ordine analitico [la sensibilità funzionale di questo test è collocata intorno alla concentrazione di $0.01 \mu\text{g/L}$ di cTnT e consente quindi ottime precisioni anche a concentrazioni molto basse (12)]. Mentre l'ACS cTnI mostrava una correlazione altamente significativa con la cTnT, il confronto Access/Elecsys forniva risultati assolutamente non comparabili. Ciò di fatto eliminava l'ipotesi che la diversa percentuale di positivi sopra riportata fosse dovuta ad una presunta differenza nel comportamento tra cTnI e cTnT, nel qual caso infatti anche l'ACS non avrebbe correlato con l'Elecsys. Rimaneva invece l'ipotesi che una imprecisione troppo elevata dell'Access a bassi livelli di concentrazione potesse influire sui risultati. Un protocollo di valutazione della stessa, sempre in confronto ad Elecsys ed ACS, confermava infatti la relativamente più elevata imprecisione dell'Access. Mediante l'impiego di uno stesso pool di sieri umani con adeguate concentrazioni di tropo-

nina, i risultati ottenuti (CV fra i giorni, per un mese) erano rispettivamente: Access cTnI, CV = 12.9% per una concentrazione media di $0.08 \mu\text{g/L}$ (pari a 2.7 volte il limite superiore di riferimento); ACS cTnI, CV = 8.2% per una concentrazione media di $0.67 \mu\text{g/L}$ (3.3 volte il limite superiore di riferimento); Elecsys cTnT, CV = 6.3% per una concentrazione media di $0.06 \mu\text{g/L}$ (3 volte il limite di riferimento).

Seppur assolutamente consapevoli che una definitiva spiegazione alle discordanze riscontrate possa venire esclusivamente dalla valutazione dell'eventuale significato clinico che assumono i valori ottenuti con i diversi analizzatori nei singoli pazienti (ma da questo punto di vista mancano degli standard clinici di confronto che ci permettano di identificare indipendentemente la presenza di un "danno miocardico" in questi pazienti), non ci siamo comunque sentiti di avallare la sostituzione della determinazione della cTnT nel protocollo 'bianco' con quella della cTnI determinata con Access, continuando per ora ad usare la cTnI per la diagnosi di IMA e la cTnT per la stratificazione del rischio, in attesa di poter disporre di un dosaggio di cTnI con più elevata sensibilità funzionale.

Il tempo di risposta ("Turnaround time", TAT)

La Fig. IV riporta il TAT medio per i protocolli biochimici, dal momento dell'invio del campione dall'UTIC al momento della ricezione del referto da parte del Cardiologo nello stesso reparto, suddivisi in base ai giorni della settimana nei quali il Laboratorio è operativo. Si nota chiaramente che, ad esclusione del lunedì mattina quando necessitano più di tre ore per ottenere i risultati, per tutto il resto della settimana il TAT è stabilizzato intorno ad una media di 2.5 ore. L'incremento del TAT il lunedì mattina è molto semplicemente spiegabile con il significativo aumento del numero delle determinazioni rispetto agli altri momenti della settimana, per un accumulo dovuto al

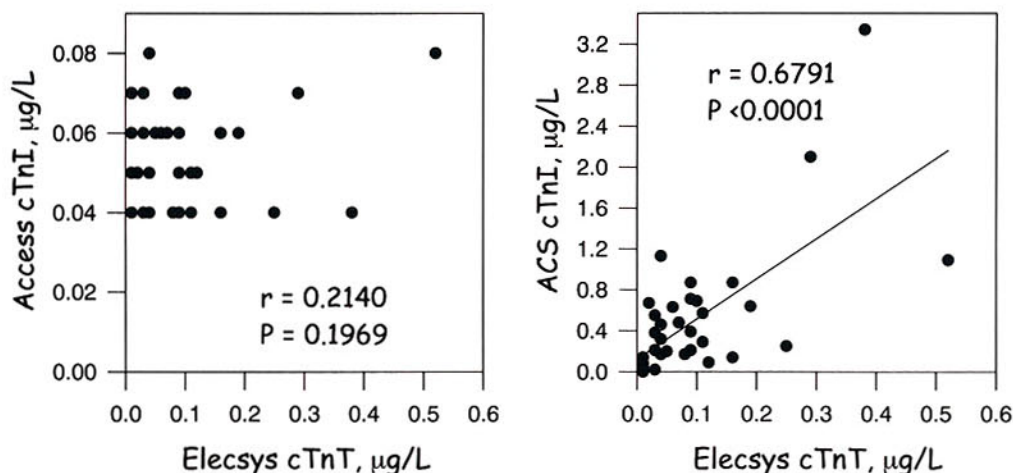


Figura III
Confronto fra i risultati ottenuti con due metodi per la determinazione della troponina I cardiaca (cTnI) e quelli della troponina T cardiaca (cTnT).
Per la tipologia e la selezione dei campioni utilizzati ($n = 39$), vedere il testo

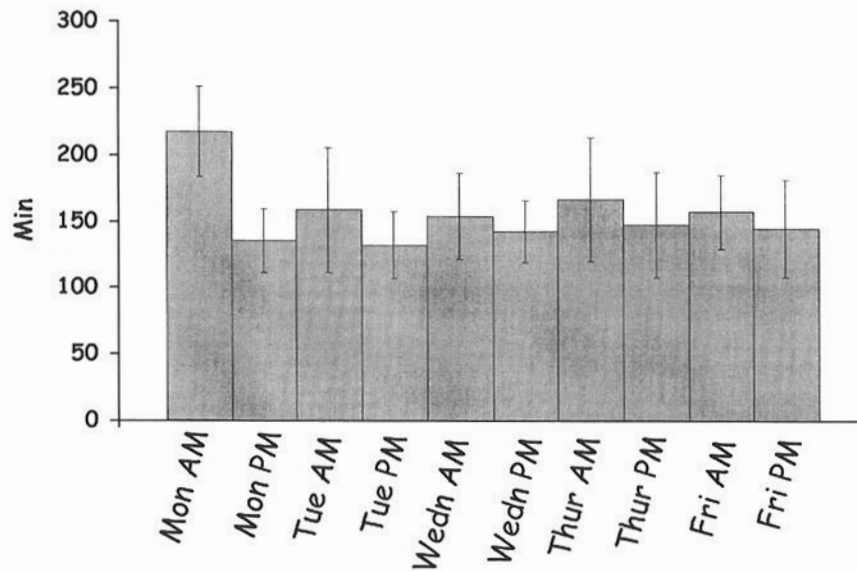


Figura IV

Tempi di risposta in minuti (mediana 147 minuti) per i protocolli biochimici suddivisi in base ai giorni della settimana.

Per "tempo di risposta" si intende il tempo che intercorre tra l'invio del campione dall'Unità di Terapia Intensiva Coronarica al Laboratorio e il momento della ricezione del referto da parte del Cardiologo nello stesso reparto

"week end".

Seppur stimando sostanzialmente buona la situazione per alcune problematiche insite nella logistica della nostra realtà (mancanza di un sistema di posta pneumatica, relativamente grande distanza tra l'UTIC, situata al II° piano del Policlinico Satellite ed il Laboratorio, situato in un corpo del Padiglione B dell'Ospedale Centrale) e dovendo sottolineare la non estrema urgenza dei risultati di alcuni protocolli (si pensi, per esempio, a quello di monitoraggio dell'IMA), si è pensato comunque ad alcuni correttivi possibili da introdurre al fine di ridurre significativamente il TAT (13). Il primo è stato quello di creare due processi esecutivi indipendenti all'interno del Laboratorio, il primo, di immediata effettuazione, per i protocolli diagnostici ('verde' e 'bianco') ed un secondo, di successiva effettuazione, per il protocollo di monitoraggio ('rosso'). Il secondo correttivo studiato è stata la possibilità di sostituire l'impiego del siero con quello del plasma eparinato per il dosaggio dei marcatori, al fine di eliminare il tempo necessario per la coagulazione, riducendo quindi i tempi preanalitici totali (14).

L'interferenza da anticoagulanti

Essendo già stata studiata e dimostrata una significativa interferenza da parte dell'uso di eparina come anticoagulante sul metodo Access cTnI e la conseguente impossibilità di utilizzare campioni di plasma eparinato per tale misura (15), la nostra attenzione si è rivolta al possibile effetto di tale anticoagulante su cTnT e CK-MB determinati su Elecsys e sulla cTnI determinata su ACS:180 (considerata come possibile sostituto dell'Access).

Per quanto riguarda l'Elecsys, un'esperienza preliminare (16) ci aveva già fatto concludere che per la deter-

minazione della CK-MB su plasma eparinato nessuna interferenza significativa poteva essere evidenziata (Tabella 1). Viceversa, già in questa esperienza preliminare, la determinazione della cTnT sembrava soffrire di una certa influenza da parte dell'eparina (16). Abbiamo così condotto uno studio più approfondito sul possibile effetto dell'impiego di plasma eparinato sul dosaggio Elecsys cTnT. I risultati, presentati nella Fig. V, hanno confermato la possibilità che in alcuni campioni si possano avere marcate sovra- o sottostime, anche dell'ordine del 40-50%, rispetto ai valori ottenuti su siero. Ci troviamo quindi attualmente nell'impossibilità pratica di utilizzare plasma eparinato al posto del siero per quanto riguarda sia il protocollo 'bianco' che quello 'rosso', avendo quest'ultimo inserito nel prelievo al ricovero anche il dosaggio della cTnT. Viceversa, abbiamo recentemente dimostrato che, relativamente al dosaggio ACS cTnI, è possibile utilizzare senza problemi l'eparina come anticoagulante al posto del siero (17).

Dai nostri dati, 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 recentemente 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 evidenziate (9,13,18).

CONCLUSIONE

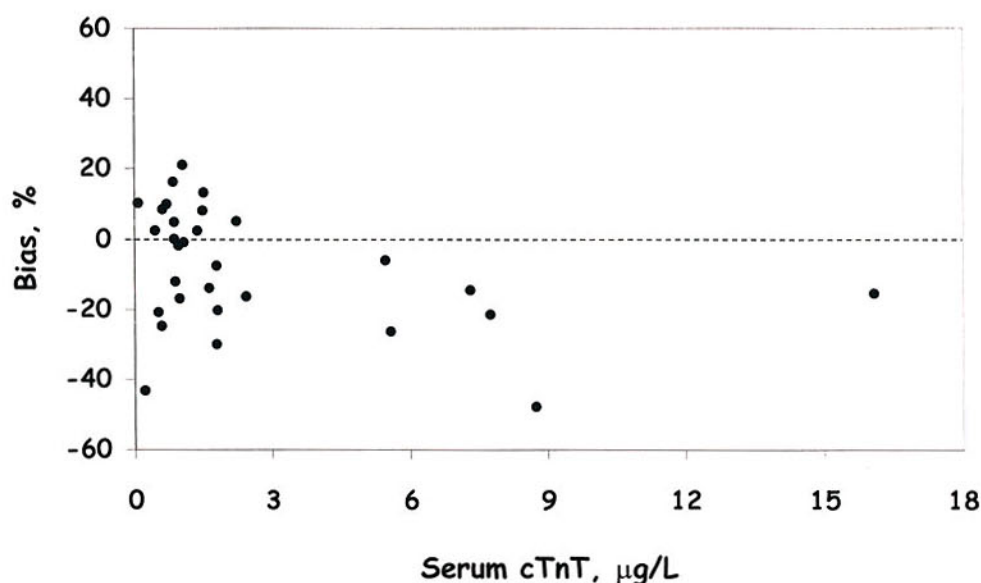
La disponibilità dei nuovi marcatori biochimici di danno miocardico ha dato origine ad una vera e propria prolife-

Tabella 1

Valutazione del possibile impiego di plasma (litio)eparinato al posto del siero per la determinazione della CK-MB su analizzatore Roche Elecsys

	Siero CK-MB, $\mu\text{g/L}^*$	Plasma CK-MB, $\mu\text{g/L}^*$	Recupero
Soggetto 1	9	9	100.0%
Soggetto 2	94	95	101.1%
Soggetto 3	44	44	100.0%
Soggetto 4	19	17	89.5%
Soggetto 5	297	312	105.1%
		Recupero medio:	99.1 \pm 5.8%

*Valore mediano da cinque determinazioni ripetute

**Figura V**

Differenza in percentuale della concentrazione della troponina T cardiaca (cTnT) determinata in campioni contemporanei di plasma eparinato (litio eparina) e siero con analizzatore Elecsys (Roche Diagnostics)

razione di proposte relative a protocolli ed algoritmi per la valutazione del paziente con dolore toracico e sospetto di SCA (11). Al di là della loro elaborazione, principalmente dipendente dalle diverse problematiche insite nelle singole realtà sanitarie, il problema principale, nel caso della loro introduzione pratica, è quello di convincere i potenziali utilizzatori ad impiegare questi protocolli (6). La nostra esperienza sta dimostrando che la collaborazione e cooperazione fra soggetti con differenti competenze e ruoli all'interno dell'organizzazione ospedaliera può raggiungere questo obiettivo, consentendo anche un continuo miglioramento dei processi elaborati, con l'eventuale introduzione anche di cambiamenti atti ad ulteriormente migliorare i risultati ottenuti.

RINGRAZIAMENTI

La T.L. Francesca Stefani, insieme alla collega Carla Bosio, ha collaborato con l'esecuzione di tutte le operative tecniche e di archiviazione dei dati. La caposala ed il personale infermieristico e ausiliario della sezione UTIC

dell'U.O. Cardiologia Spedali Civili hanno realizzato e posto in opera tutte le operative assistenziali previste dalle mappe di cura.

BIBLIOGRAFIA

1. Panteghini M, Cuccia C, Pagani F, Bonetti G. Gli "enzimi cardiaci" nell'era delle troponine: cosa salvare. *Biochim Clin* 1999;23:378-85.
2. Panteghini M, Bonora R, Pagani F, Buffoli F, Cuccia C. Rapid, highly sensitive immunoassay for determination of cardiac troponin I in patients with myocardial cell damage. *Clin Chem* 1997;43:1464-5.
3. Panteghini M. IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage: premises and project presentation. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:887-93.
4. Bonetti G, Pagani F, Panteghini M. Evaluation of the Elecsys electrochemiluminescent immunoassay for cardiac troponin T determination. *Biochim Clin* 1999;23:161-4.
5. Stubbs P. The cardiac troponins: uses in routine clinical practice. *Eur Heart J* 1998;19(suppl N):N59-63.
6. Lee TH. Chest pain algorithms in the troponin era: time to integrate expertise. *Am Heart J* 1999;138:606-8.

7. Panteghini M. Standardization activities of markers of cardiac damage: the need of a comprehensive approach. *Eur Heart J* 1998;19(suppl N):N8-11.
8. Bonetti G, Pagani F, Panteghini M. Standardizzazione dei marcatori biochimici di lesione miocardica: problematiche e analisi delle attività internazionali. *Biochim Clin* 1998;22:496-502.
9. Panteghini M, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Wu AHB. Use of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:687-93.
10. Panteghini M. Present issues in the determination of troponins and other markers of cardiac damage. *Clin Biochem* 2000;33:161-6.
11. Panteghini M. Biochemical assessment of myocardial damage with new diagnostic tools. *Cardiologia* 1999;44:419-25.
12. Hallermayer K, Klenner D, Vogel R. Use of recombinant human cardiac troponin T for standardization of third generation troponin T methods. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(suppl 230):128-31.
13. Panteghini M, Dolci A, Galvani M, Ottani F, et al. Marcatori biochimici di danno miocardico nelle sindromi coronariche acute. Premesse e suggerimenti per l'ottimizzazione del loro impiego nella pratica clinica. *Biochim Clin* 1998;22:516-22.
14. Panteghini M, Pagani F, Bonetti G. Problemi e soluzioni nella diagnostica biochimica del danno miocardico. *J Clin Ligand Assay* 1999;22:245-50.
15. Tate JR, Heathcote D, Rayfield J, Hickman P. The lack of standardization of cardiac troponin I assay systems. *Clin Chim Acta* 1999;284:141-9.
16. Bonetti G, Stefani F, Rota F, Cuccia C, et al. Comparison of different samples for determination of cardiac markers by Elecsys immunoassay system. Presented at the IFCC WorldLab Satellite Meeting 'Novel aspects of enzymes in human disease'. Venezia, 4 giugno 1999.
17. Pagani F, Bonetti G, Stefani F, Cuccia C, Panteghini M. Serum and plasma samples for ACS: Systems cardiac markers. *Clin Chem* 2000;46:1020-3.
18. Wu AHB, 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.