

Valutazione multicentrica di cinque metodi per la determinazione della mioglobina del siero*

Sara Altinier,¹ Paolo Amboni,² Roberto Bonora,³ Antonio Brustia,⁴ Alberto Dolci,⁵ Andrea Motta,⁶ Franca Pagani,³ Patrizia Pergolini,⁴ Arialdo Vernocchi,² Martina Zaninotto,¹ Mario Plebani,¹ Mauro Panteghini^{3**} a nome del Gruppo di Studio Intersocietario 'Marcatori di Lesione Miocardica' della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) e della Società Italiana di Medicina di Laboratorio (SIMeL)

¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale, Padova

²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Ospedali Riuniti, Bergamo

³Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia

⁴Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera 'Maggiore della Carità', Novara

⁵Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Casa di Cura S. Maria, Castellanza VA

⁶Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Istituto Scientifico H. San Raffaele, Milano

*Questo articolo è basato su uno studio precedentemente riportato in *Clinical Chemistry* (Clin Chem 2000;46:1631-7), anche se in forma e contenuti parzialmente diversi.

Il presente lavoro è stato in parte presentato durante il 29° Congresso Nazionale SIBioC, 4-7 novembre 1997, Napoli (Biochim Clin 1997;21:428), e l'11° Congresso Nazionale SIMeL, 27-29 novembre 1997, Chianciano Terme (Med Lab 1997;5:463).

**Coordinatore del Gruppo di Studio, al quale la corrispondenza deve essere inviata all'indirizzo: Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', 25125 Brescia, fax 0303995369, e-mail panteghi@bshosp.osp.unibs.it

ABSTRACT

Multicenter evaluation of five assays for myoglobin determination

A multicenter study was carried out to compare the analytical performance of five commercially available assays for myoglobin measurement. Linearity, imprecision, interferences, and method comparison were studied according to NCCLS guidelines, whereas reference values were determined following IFCC recommendations. BNA and Opus assays showed relatively high imprecision (all but one total CVs >7.4%). Other assays showed lower CVs, that varied, however, among laboratories, particularly at a normal myoglobin concentration (Access, 6.0 vs 10.9%; Hitachi, 3.8 vs 5.8%; Stratus, 3.4 vs 6.5%). Results were lower in anticoagulated samples on Access, in heparin and citrate samples on Stratus and in citrate samples on BNA and Opus, and increased on Hitachi with heparin and EDTA. Use of separator gel produced results significantly lower ($P < 0.001$) on Hitachi and higher ($P = 0.016$) on Opus. Bilirubin, turbidity, and hemoglobin had no effect on evaluated methods, but rheumatoid factor affected the Access. In method comparison, high correlation coefficients (≥ 0.98) were obtained. However, Stratus gave higher results, whereas Access and BNA gave the lowest. The following upper reference limits ($\mu\text{g/L}$) for men and women were obtained: Access, 70 and 52; BNA, 51 and 49; Hitachi, 67 and 58; Opus, 80 and 50; Stratus, 86 and 63. The possibility of high imprecision and marked disagreement among commercial myoglobin assays should be carefully considered in clinical practice.

RIASSUNTO

Uno studio multicentrico era condotto al fine di confrontare le caratteristiche analitiche di cinque metodi commerciali per la determinazione della mioglobina nel siero. In particolare gli studi di linearità, imprecisione, interferenza e confronto tra metodi erano condotti secondo le linee guida NCCLS, mentre i valori di riferimento erano ottenuti seguendo le raccomandazioni IFCC. I metodi BNA e Opus evidenziavano la maggiore imprecisione, mentre per gli altri metodi lo studio dell'imprecisione forniva CV migliori ma differenti nei diversi centri utilizzando lo stesso strumento, in particolare per valori di mioglobina all'interno dell'intervallo di riferimento (Access 6.0 vs 10.9%; Hitachi 3.8 vs 5.8%; Stratus 3.4 vs 6.5%). Il confronto con i risultati ottenuti nel siero evidenziava che sullo strumento Hitachi campioni prelevati in litio eparina e EDTA-K₃ forniscono valori più elevati, valori più bassi si ottengono con BNA e Opus in campioni con sodio citrato e con Stratus in campioni con litio eparina e sodio citrato, mentre sullo strumento Access risultati più bassi si ottengono in tutti i campioni prelevati con anticoagulante, indipendentemente dal tipo di quest'ultimo. L'impiego di gel separatore riduce significativamente i valori sull'Hitachi e li aumenta sull'Opus. Per nessuno dei metodi valutati erano rilevate interferenze da bilirubina, trigliceridi o emolisi, mentre concentrazioni elevate di fattore reumatoide interferivano

nelle determinazioni effettuate sullo strumento Access. Il confronto tra metodi mostrava ottimi coefficienti di correlazione (≥ 0.98), anche se lo Stratus forniva concentrazioni di mioglobina mediamente più elevate, e Access e BNA valori più bassi. I limiti superiori di riferimento, calcolati rispettivamente per uomini e donne, erano: 70 e 52 $\mu\text{g/L}$ per l'Access, 51 e 49 $\mu\text{g/L}$ per il BNA, 67 e 58 $\mu\text{g/L}$ per l'Hitachi, 80 e 50 $\mu\text{g/L}$ per l'Opus e 86 e 63 $\mu\text{g/L}$ per lo Stratus. In conclusione, la possibilità di un'impresione strumentale troppo elevata e la mancanza di standardizzazione tra diversi metodi di determinazione della mioglobina devono essere tenuti attentamente in considerazione nell'applicazione clinica di questa determinazione.

INTRODUZIONE

La mioglobina, proteina di basso peso molecolare presente nel citoplasma della muscolatura cardiaca e scheletrica, è stata recentemente confermata come il marcatore commercialmente disponibile più precocemente rilasciato in seguito ad infarto miocardico acuto (1). Per la sua determinazione, nel corso degli ultimi vent'anni sono stati introdotti numerosi metodi caratterizzati, oltre che da buone prestazioni analitiche, anche da un tempo di esecuzione molto contenuto (2). La disponibilità di metodi semplici e rapidi ha quindi fortemente supportato l'impiego clinico della mioglobina in condizioni di emergenza, quali quelle rappresentate dalla diagnosi precoce e, più in generale, dalla gestione del paziente con infarto miocardico (3). Tuttavia, la mancanza di standardizzazione metodologica, come pure quella di materiali di riferimento certificati, associate alla diffusione di numerosi metodi analitici e alla continua commercializzazione da parte dell'industria di nuovi metodi di misura, potrebbero avere come conseguenza una significativa differenza nei risultati ottenuti in diversi laboratori. Scopo di questo lavoro è stato quello di confrontare, attraverso una valutazione multicentrica, le prestazioni analitiche di cinque metodi commerciali tra i più diffusi in Italia per il dosaggio della mioglobina (4).

MATERIALI E METODI

Sono stati valutati 5 metodi di tre diverse aziende, ciascuno eseguito in due diversi laboratori: a) Beckman Coulter Access (lab. 2 e 3); b) Dade Behring BNA (lab. 1 e 5); c) Dade Behring Opus (lab. 2 e 5); d) Dade Behring Stratus (lab. 3 e 4); e) Roche Hitachi (lab. 1 e 4). Tutte le determinazioni sono state effettuate seguendo le istruzioni fornite dalle ditte produttrici relativamente alla preparazione e conservazione di reagenti, calibratori e controlli, come pure per quanto attiene alla frequenza di calibrazione.

Linearità. Lo studio è stato condotto, in accordo a quanto riportato nel documento NCCLS EP6-P (5), utilizzando pool di sieri umani con concentrazioni di mioglobina eccedenti di circa il 30% il valore del calibratore più alto di ciascun metodo. Da ognuno di questi pool sono state ottenute, utilizzando per ciascun metodo il proprio diluente, quattro diluizioni (3:4, 1:2, 1:4, 1:5), ognuna delle quali era analizzata 4 volte nella stessa seduta.

Precisione. Sono stati preparati, aliquotati, congelati e inviati a tutti i centri partecipanti tre pool di sieri umani con concentrazioni di mioglobina normale (50 $\mu\text{g/L}$), 'borderline' (100 $\mu\text{g/L}$) ed elevata (300 $\mu\text{g/L}$). L'impresione è stata

valutata mediante l'analisi della varianza secondo le modalità descritte nel documento NCCLS EP5-A, che prevede l'analisi di ogni campione in doppio in sedute giornaliere per 20 giorni successivi (6).

Studio delle interferenze. a) Anticoagulanti. Sono stati selezionati 51 soggetti ai quali, previo consenso informato, è stato eseguito un prelievo venoso durante il quale il sangue è stato raccolto utilizzando provette (Becton Dickinson) per siero senza alcun additivo, provette con gel separatore, e provette con litio eparina, sodio citrato e EDTA- K_3 . I risultati dei vari tipi di campione sono stati confrontati con i valori ottenuti nel siero e la significatività della differenza è stata calcolata utilizzando il test di Wilcoxon per dati appaiati.

b) Interferenti endogeni. In accordo a quanto riportato nel documento NCCLS EP7-P (7), a due pool di sieri con concentrazioni di mioglobina normale ed aumentata (60 $\mu\text{g/L}$ e 110 $\mu\text{g/L}$, rispettivamente) sono stati aggiunti albumina (concentrazione finale, 100 g/L), bilirubina (concentrazione finale, 30 mg/dL), emoglobina (concentrazione finale, 10 g/L) e una soluzione Intralipid al 20%, nella misura di una parte di interferente e 19 parti di pool. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli delle rispettive soluzioni di controllo ottenute utilizzando gli stessi pool, in cui al posto della sostanza interferente è stato aggiunto nelle stesse proporzioni il diluente raccomandato dalla ditta. Tutti questi campioni sono stati analizzati 10 volte in sequenza casuale per minimizzare un possibile errore dovuto ad un effetto di deriva. Tenendo conto dell'impresione analitica dei diversi metodi, era considerata significativa una differenza $> 10\%$ tra i risultati ottenuti in presenza e in assenza della sostanza interferente analizzata. Per valutare l'interferenza da fattore reumatoide (FR) sono stati misurati in doppio 10 campioni con elevate concentrazioni di FR (da 48 a 3020 kU/L; metodo nefelometrico BNA, limite superiore di riferimento = 20 kU/L) e sono state confrontate le medie dei risultati ottenuti nei singoli campioni con i diversi strumenti.

Confronto tra metodi. Su ogni strumento sono stati analizzati in doppio, in cinque giorni diversi, 40 campioni (8 campioni al giorno): 20 con concentrazioni di mioglobina comprese tra 30 e 50 $\mu\text{g/L}$, 16 tra 50 e 200 $\mu\text{g/L}$, e quattro tra 200 e 400 $\mu\text{g/L}$ (8). Per minimizzare i possibili effetti di 'carryover', in ogni seduta le due aliquote sono state analizzate in due sequenze inverse.

Valori di riferimento. Sono stati studiati 208 soggetti (103 femmine e 105 maschi, età compresa tra 13 e 87 anni) apparentemente sani, selezionati in base a criteri di esclusione *a priori* descritti nei documenti IFCC relativi agli

intervalli di riferimento (9). E' stato inoltre introdotto un criterio aggiuntivo rappresentato da valori di attività sierica dell'enzima creatinichinasi >150 U/L (metodo IFCC eseguito a 37°C) al fine di escludere individui che avessero recentemente svolto una intensa attività muscolare, possibile causa di aumento delle concentrazioni di mioglobina nel sangue. I limiti di riferimento sono stati ottenuti mediante il calcolo non parametrico dei percentili (10).

RISULTATI

Linearità'

La Tabella 1 riassume i risultati dello studio della linearità della risposta analitica dei metodi valutati. Nel caso dello strumento Access, visto l'ampio intervallo di concentrazione compreso nella curva di calibrazione, la prova era ripetuta per un intervallo di concentrazione più basso e ristretto. In alcuni casi, l'ipotesi di uguaglianza della varianza delle varie diluizioni era rigettata, o per una relativamente elevata imprecisione delle quattro determinazioni di ciascuna diluizione (vedi il caso dell'Access, per le concentrazioni elevate di mioglobina nel primo esperimento, del BNA e dell'Opus), oppure a causa di varianze molto piccole nelle determinazioni dei vari punti, nel caso di uno strumento molto preciso come l'Hitachi nel lab. 1. I valori del coefficiente G evidenziavano un'accettabile linearità' della risposta analitica per tutti i metodi, ad eccezione di quello Hitachi. In quest'ultimo caso, anche se l'elaborazione statistica ha identificato una mancanza di linearità tra i dati (cosa peraltro probabilmente dovuta alla più alta precisione analitica di questo metodo), l'ispezione visuale di questi permetteva tuttavia di concludere per un'accettabilità della linearità dal punto di vista clinico, cosa anche confermata dai coefficienti di correlazione per questo metodo, i più elevati tra quelli ottenuti per gli

strumenti valutati.

Imprecisione

I risultati dello studio dell'imprecisione sono riportati nella Tabella 2. BNA e Opus mostravano un'imprecisione relativamente più elevata rispetto agli altri metodi, che peraltro fornivano CV significativamente differenti nei due laboratori in cui veniva utilizzato lo stesso strumento. In termini assoluti, il livello di imprecisione strumentale può essere valutato sulla base degli obiettivi analitici ricavati dai dati della variabilità biologica della mioglobina nel siero (11). Tale criterio identifica come ottimale un CV <2.8%, desiderabile un CV <5.6% e minimamente accettabile un CV <8.3%. Nessuno dei metodi forniva prestazioni ottimali ai tre livelli di concentrazione di mioglobina considerati, due strumenti fornivano risultati ritenuti desiderabili ma in un solo laboratorio (Hitachi e Stratus nel lab. 4), mentre tre strumenti, di cui due in un centro (Access in lab. 3 e Opus in lab. 2) e uno (BNA) in entrambi i centri che lo utilizzavano, non raggiungevano nemmeno, per una o più concentrazioni, i requisiti minimi di imprecisione stabiliti. Complessivamente, Hitachi e Stratus evidenziavano caratteristiche di precisione migliori rispetto a quelle degli altri analizzatori.

Interferenze

La Tabella 3 mostra come l'impiego dei diversi tipi di anticoagulanti possa interferire in modo differente nei metodi per la misura della mioglobina. Non solo gli anticoagulanti ma anche l'impiego del gel separatore nella provetta di prelievo interferiva su alcuni metodi (Hitachi e Opus).

Per quanto riguarda la valutazione degli interferenti di origine endogena, tutte le sostanze valutate hanno mo-

Tabella 1
Risultati degli studi di linearità

Metodo/Laboratorio	Intervallo di calibrazione del metodo	Intervallo valutato	Uguaglianza della varianza delle varie diluizioni (C) ^a	Linearità (G) ^b	Coefficiente di correlazione (r)
Access - Lab. 2 - 1° esp.	10 - 4300 µg/L	660 - 2700 µg/L	0.853	1.12	0.9964
Access - Lab. 2 - 2° esp.	idem	120 - 390 µg/L	0.045	0.44	0.9986
Access - Lab. 3 - 1° esp.	idem	720 - 2700 µg/L	0.934	0.11	0.9976
Access - Lab. 3 - 2° esp.	idem	100 - 370 µg/L	0.436	2.65	0.9994
BNA - Lab. 1	25 - 400 µg/L	75 - 300 µg/L	0.855	1.26	0.9988
BNA - Lab. 5	idem	75 - 300 µg/L	0.800	0.11	0.9979
Hitachi - Lab. 1	3 - 600 µg/L	160 - 570 µg/L	0.753	8.36	0.9997
Hitachi - Lab. 4	idem	160 - 570 µg/L	0.522	23.31	0.9998
Opus - Lab. 2	1 - 500 µg/L	125 - 450 µg/L	0.655	3.85	0.9899
Opus - Lab. 5	idem	125 - 450 µg/L	0.787	0.37	0.9949
Stratus - Lab. 3	1 - 1000 µg/L	180 - 570 µg/L	0.273	3.46	0.9966
Stratus - Lab. 4	idem	250 - 870 µg/L	0.629	0.11	0.9977

^aper valori di C >0.684, l'ipotesi di uguaglianza della varianza delle diluizioni è rigettata con una P <0.05

^bper valori di G >3.89, l'ipotesi di una risposta lineare è rigettata con una P <0.05.

Tabella 2
Risultati dello studio dell'imprecisione

Metodo/Laboratorio	Mioglobina, µg/L	CV _w , %	CV _T , %	Metodo/Laboratorio	Mioglobina, µg/L	CV _w , %	CV _T , %
Access - Lab. 2	54.1	4.0	6.0	Access - Lab. 3	52.0	5.3	10.9
	97.5	2.1	3.7		98.6	2.9	6.6
	229.9	2.4	4.0		253.5	2.1	4.9
BNA - Lab. 1	50.0	3.0	8.0	BNA - Lab. 5	44.4	4.7	8.7
	97.1	3.4	10.6		92.3	2.7	5.0
	254.1	2.8	9.0		258.3	3.7	8.2
Hitachi - Lab. 1	68.8	1.3	5.8	Hitachi - Lab. 4	62.5	2.4	3.8
	107.2	1.6	4.7		112.5	1.2	2.0
	290.7	0.9	4.1		330.8	0.6	2.7
Opus - Lab. 2	53.6	5.2	9.5	Opus - Lab. 5	61.6	5.1	7.7
	104.0	4.9	8.6		103.6	3.9	7.8
	297.7	5.2	8.7		275.4	3.8	7.4
Stratus - Lab. 3	69.7	3.6	6.5	Stratus - Lab. 4	83.0	1.9	3.4
	117.8	2.2	4.1		147.2	1.7	3.1
	300.5	2.3	3.6		386.5	2.4	3.2

CV_w, coefficiente di variazione nella serie ; CV_T, coefficiente di variazione totale

Tabella 3
Risultati dello studio delle possibili interferenze da anticoagulanti e gel separatore

Metodo	Gel separatore	Eparina	EDTA	Citrato
Access	0.3%	-9.8%	-13.8%	-30.2%
	(-6.2/6.9)	(-16/-3.6)	(-20.1/-7.5)	(-36.7/-23.6)
	NS	P=0.003	P<0.001	P<0.001
BNA	-4.9%	-4.8%	-6.3%	-13.1%
	(-11.2/1.5)	(-16.9/7.3)	(-14.8/2.1)	(-25.8/-0.4)
	NS	NS	NS	P=0.046
Hitachi	-25.8%	10.6%	7.8%	-1.6%
	(-31.7/-20.0)	(5.6/15.5)	(4.2/11.4)	(-7.2/4.0)
	p<0.001	p<0.001	P<0.001	NS
Opus	6.1%	1.1%	-4.0%	-12.1
	(1.5/10.7)	(-3.6/5.8)	(-9.2/1.1)	(-21.7/-2.5)
	P=0.016	NS	NS	P<0.001
Stratus	2.1%	-6.0%	2.2%	-18.6%
	(-1.5/5.8)	(-13/-1.0)	(-1.9/6.3)	(-22.0/-15.2)
	NS	P=0.002	NS	P<0.001

I risultati sono espressi come media delle differenze in percentuale (e 95% intervallo di confidenza) tra il valore ottenuto nel prelievo con l'anticoagulante ed il valore ottenuto nel corrispondente campione di siero.
NS, non significativo

strato interferenze significative ($P < 0.05$), sia in positivo che in negativo, sul BNA e sull'Hitachi, mentre nessuna interferenza era rilevata con il metodo Access (Tabella 4). Considerando il limite di accettabilità dell'interferenza, identificato *a priori* con $\pm 10\%$ rispetto ai valori ottenuti nei corrispondenti pool privi di sostanza "interferente", si osservava tuttavia solamente una marcata interferenza da parte della bilirubina sull'Opus e sullo Stratus, i due metodi a rivelazione fluorimetrica. Poiché per lo studio era stata

utilizzata bilirubina purificata da calcoli biliari di origine bovina (Sigma), che possiede una fluorescenza intrinseca molto elevata, si è deciso di ripetere l'esperimento procedendo a diluizioni seriate di due sieri umani con elevata (51 mg/dL) e bassa (0.3 mg/dL) concentrazione di bilirubina. In questo caso, ad una concentrazione di bilirubina di 30.6 mg/dL, si otteneva un recupero medio di mioglobina del 96.1% sull'Opus e del 100.9% sullo Stratus, dimostrando quindi che non vi è interferenza da parte della bilirubina

Tabella 4

Risultati dello studio dell'interferenza da sostanze endogene

Interferente/Pool	Access	BNA	Hitachi	Opus	Stratus
Albumina (100 g/L) in pool normale	-1.9% (1.6/-5.4)	8.3% (11.6/5.0)	7.5% (8.5/6.4)	3.6% (10.6/-3.5)	3.5% (4.1/2.8)
Albumina (100 g/L) in pool alto	0.4% (3.2/-2.5)	9.4% (11.0/7.7)	5.2% (5.8/4.6)	5.5% (13.0/-2.0)	2.1% (2.8/1.5)
Bilirubina (30 mg/dL) in pool normale	2.4% (7.1/-2.3)	-3.9% (-1.7/-6.2)	3.5% (4.1/2.8)	-74.9% (-73.7/-76.2)	-24.0% (-21.7/-26.3)
Bilirubina (30 mg/dL) in pool alto	2.2% (5.5/-1.2)	-2.9% (-0.2/-5.6)	2.1% (2.8/1.5)	-76.1% (-73.9/-78.3)	-21.2% (-19.0/-23.3)
Emoglobina (10 g/L) in pool normale	1.3% (5.8/-3.2)	7.1% (8.4/5.7)	-8.1% (-6.8/-9.5)	8.5% (17.6/-0.6)	-3.9% (0.1/-7.9)
Emoglobina (10 g/L) in pool alto	-1.2% (0.7/-3.0)	4.5% (6.2/2.8)	-4.2% (-3.6/-4.7)	-2.6% (11.9/-17.0)	-3.7% (-2.0/-5.4)
Intralipid (1%) in pool normale	-2.0% (1.9/-5.9)	-8.7% (-4.2/-13.3)	-3.7% (-2.3/-5.2)	4.2% (11.8/-3.5)	0.4% (3.0/-2.2)
Intralipid (1%) in pool alto	2.8% (6.7/-1.2)	-5.4% (-1.2/-9.7)	-3.9% (-3.2/-4.5)	5.8% (13.0/-1.4)	-0.4% (1.8/-2.6)

I risultati sono espressi come media delle differenze in percentuale (e 95% intervallo di confidenza) tra il valore ottenuto nel pool 'test' (interferente presente) e quello ottenuto nel pool di controllo (interferente assente)

Tabella 5

Valutazione dell'interferenza da fattore reumatoide

Fattore reumatoide, KU/L ^a	Access, µg/L	BNA, µg/L	Hitachi, µg/L	Opus, µg/L	Stratus, µg/L
48	47.2	40	55.7	47.4	46.7
53	53.3	36	56.4	60.1	47.7
60	49.2	38	55.4	48.5	47.1
608	91.7 ^b	<26	38.5	29.2	29.4
854	113.6 ^b	<26	20.9	42.2	32.6
1220	113.4 ^b	<26	32.2	20.2	24.9
1430	15.3	<26	22.0	43.8	22.4
1440	150.5 ^b	<26	30.8	22.4	27.7
1480	12.4	<26	57.0	53.5	20.5
3020	297.3 ^b	<26	33.8	23.3	25.7

^a Metodo nefelometrico latex (limite superiore di riferimento = 20 KU/L).

^b Concentrazione di mioglobina superiore al cutoff raccomandato dalla ditta

sierica in questi due metodi.

Come riportato nella Tabella 5, in presenza di elevate concentrazioni di FR (>600 KU/L) solo l'Access tra i metodi valutati mostrava risultati frequentemente più elevati del cutoff raccomandato dalla ditta produttrice (70 µg/L), mentre gli altri quattro metodi fornivano risultati sempre inferiori al rispettivo cutoff dichiarato dalle relative ditte. Sembrava tuttavia non esistere una stretta relazione tra concentrazione di FR e grado di interferenza nel metodo.

Confronto fra metodi

Nella Tabella 6 vengono riportati i risultati del confronto tra i metodi. Al di là dei coefficienti di correlazione che

risultano sempre ottimi, si osservavano dei significativi scostamenti sia di tipo proporzionale che costante. Lo Stratus forniva i valori mediamente più elevati, mentre l'Access e il BNA fornivano i risultati più bassi. Tutte le correlazioni che coinvolgevano l'Hitachi mostravano uno scostamento di tipo costante positivo per questo strumento.

Valori di riferimento

Dal momento che è nota una significativa differenza tra sessi nelle concentrazioni di mioglobina, la valutazione dei limiti di riferimento era effettuata separatamente per maschi e femmine. I risultati sono riportati nella Tabella 7.

Tabella 6

Risultati del confronto tra i metodi

y	x	n	Slope (DS)	Intercetta (DS)	Coefficiente di correlazione (r)
Access	BNA	29 ^a	0.87 (0.10)	5.7 (8.4)	0.99
Access	Opus	40	0.80 (0.13)	5.5 (8.2)	0.99
Access	Stratus	40	0.75 (0.12)	0.3 (8.1)	0.99
BNA	Opus	29 ^a	0.86 (0.16)	4.5 (10.9)	0.99
BNA	Stratus	29 ^a	0.82 (0.10)	-2.1 (10.0)	0.99
Hitachi	Access	40	1.13 (0.12)	9.9 (8.3)	0.99
Hitachi	BNA	29 ^a	0.98 (0.05)	13.8 (6.5)	0.99
Hitachi	Opus	40	0.86 (0.12)	17.3 (8.8)	0.99
Hitachi	Stratus	40	0.82 (0.09)	11.1 (6.8)	0.99
Opus	Stratus	40	0.88 (0.12)	-4.1 (11.0)	0.98

^aLe concentrazioni di mioglobina in 11 campioni sono risultate inferiori al limite di rivelabilità analitica del metodo BNA

Tabella 7

Limiti di riferimento (2.5-97.5° percentile) per i metodi valutati

Metodo	Maschi	Femmine
Access	5.1-69.5 µg/L	3.3-51.5 µg/L
BNA	<26 ^a -51.4 µg/L	<26 ^a -49.4 µg/L
Hitachi	9.6-67.0 µg/L	8.5-57.7 µg/L
Opus	13.8-79.8 µg/L	11.0-49.9 µg/L
Stratus	11.1-85.5 µg/L	13.4-62.7 µg/L

^aMinima concentrazione misurabile dallo strumento

Per nessuno dei metodi valutati era trovata una correlazione significativa tra i valori di mioglobina e l'età dei soggetti.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni l'approccio biochimico per l'inquadramento diagnostico dei pazienti con dolore toracico e sospetto danno miocardico è notevolmente cambiato: il progresso tecnologico e scientifico ha consentito l'introduzione di esami più sensibili e più specifici non solo nella diagnosi, ma anche nel monitoraggio e nella prognosi dei pazienti con sindrome coronarica acuta (12-15). Raccomandazioni nazionali ed internazionali suggeriscono come miglior compromesso per la diagnosi di infarto miocardico l'associazione di un marcatore precoce (i cui aumenti nel circolo ematico siano evidenziabili entro 6 ore dalla comparsa dei sintomi) ed un marcatore cardiospecifico, rappresentato dalla troponina (3, 15, 16). Come anche dimostrato da una recente rassegna sistematica della letteratura, il marcatore precoce, la cui determinazione sia commercialmente disponibile, con più dati scientifici a supporto è la mioglobina (1). Per tale motivo, tutte le aziende che si propongono sul mercato con strumenti per la misura dei marcatori cardiaci includono nel proprio

pannello la determinazione di questa proteina. Risulta ovvio che sarebbe nell'interesse sia dei laboratoristi e dei clinici, come pure delle ditte produttrici dei sistemi analitici, che i risultati ottenuti con sistemi diversi siano comunque tra loro confrontabili. I risultati di questo studio dimostrano che i diversi metodi valutati correlano bene tra loro, ma che c'è un'assoluta mancanza di standardizzazione tra metodi. I diversi risultati ottenuti dallo stesso metodo/strumento nei diversi laboratori che lo utilizzavano sottolineano come anche tra coloro che utilizzano la stessa metodologia possa mancare una omogeneità di prestazioni. Inoltre, i risultati del programma nazionale di Valutazione Esterna della Qualità, organizzato dal nostro Gruppo di Studio, confermano che per la mioglobina i valori ottenuti dai diversi analizzatori possono essere significativamente diversi tra loro (17). In questo programma, un'ampia dispersione dei risultati è osservata non solo fra sistemi di differenti ditte ma pure fra differenti analizzatori prodotti dalla stessa ditta (Fig. 1).

Il presente studio dimostra anche come alcuni metodi commercialmente disponibili non siano sufficientemente precisi, se si tiene conto delle necessità cliniche direttamente derivate dalle caratteristiche biologiche della mioglobina. Particolare attenzione deve essere inoltre posta alla possibile influenza nei diversi sistemi analitici da parte

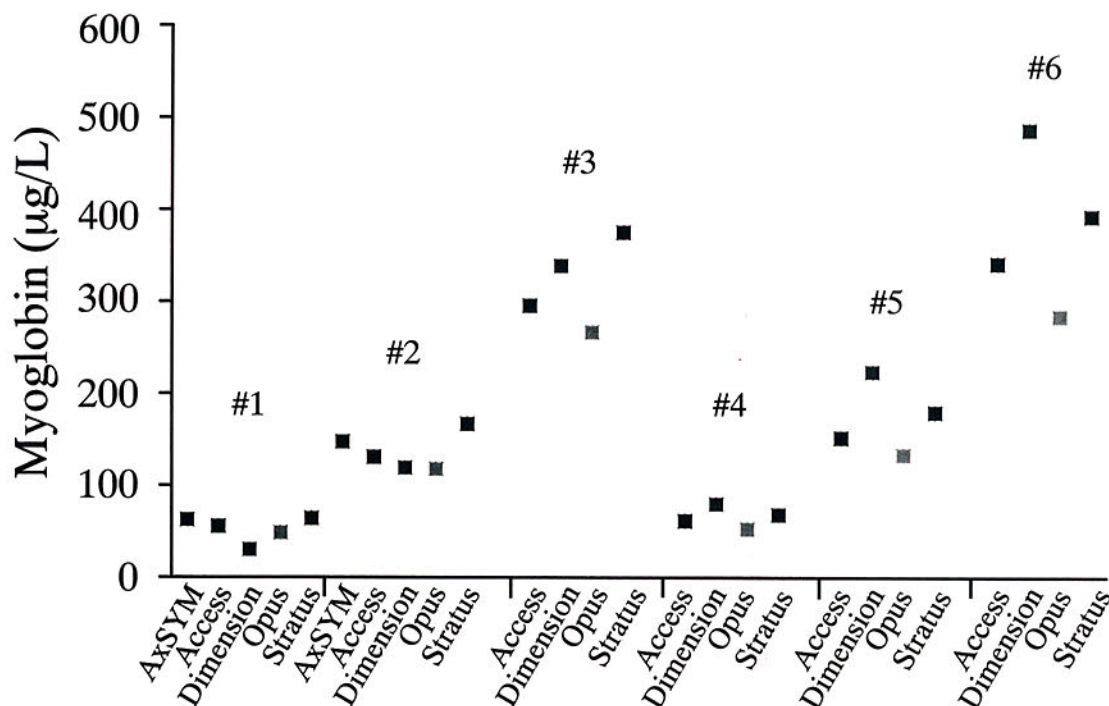


Figura 1

Medie dei risultati per la mioglobina, assemblati per strumento e per campione inviato (dal no. 1 al 6), riportati nel 1999 dai partecipanti alla Verifica Esterna di Qualità per i marcatori cardiaci organizzata dal Gruppo di Studio SIBioC-SIMeL 'Marcatori di lesione miocardica' in collaborazione con il Centro di Ricerca Biomedica di Castelfranco Veneto

dei diversi tipi di anticoagulanti e alle possibili interferenze esercitate da parte di alcune sostanze endogene. Tutti gli organismi scientifici nazionali ed internazionali concordano sul fatto che il plasma debba rappresentare il campione di scelta per l'analisi dei marcatori cardiaci al fine di ridurre il tempo relativo alla fase di preparazione preanalitica del campione (3,16). Questo studio evidenzia tuttavia come alcuni metodi per la mioglobina possano risentire in modo significativo dell'interferenza da parte di anticoagulanti presenti nel campione, dimostrando come sia tutto sommato difficile utilizzare nella pratica routinaria della determinazione dei marcatori cardiaci campioni alternativi al siero, anche su strumentazioni di recente introduzione (18).

Interferenze da FR, che può simulare la proteina che deve essere misurata, sono state recentemente segnalate anche per alcuni immunodosaggi di marcatori cardiaci (19,20). Anche in questo studio sono stati evidenziati alcuni valori falsamente elevati di mioglobina per la presenza di FR con metodo Access. Questi dati erano anche confermati in una recente esperienza, nella quale non era invece osservata alcuna interferenza nella determinazione della troponina I sullo stesso strumento (21).

In conclusione, i risultati di questo studio sottolineano l'importanza di raggiungere quanto prima un migliore livello di standardizzazione per la misura della mioglobina del siero anche in termini di massima imprecisione tollerabile e di mancanza di interferenze da parte di sostanze endogene ed esogene. Fino ad allora, la possibilità di un'eleva-

ta imprecisione e di differenze tra i valori ottenuti con i diversi metodi commerciali devono essere attentamente considerate nella pratica clinica di utilizzo di questo marcatore.

RINGRAZIAMENTI

Il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMeL 'Marcatori di Lesione Miocardica' ringrazia le aziende produttrici dei metodi valutati per aver creduto in questo progetto e averlo generosamente supportato con la fornitura di strumenti, materiali, reagenti, informazioni e consigli, senza peraltro operare alcuna interferenza nell'ottenimento e nella elaborazione dei dati. Un particolare ringraziamento a Michele Dolci (Beckman Coulter, già Sanofi Pasteur), Luigi Lazzaroni (Roche Diagnostics, già Boehringer Mannheim), Alessandro Ortisi (Dade Behring) e Antonino Sticchi (Dade Behring, già Istituto Behring).

BIBLIOGRAFIA

- Pagani F, Bonetti G, Panteghini M a nome del Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMeL "Marcatori di Lesione Miocardica". La sensibilità dei marcatori biochimici per la diagnosi di infarto miocardico: una valutazione basata sull'evidenza scientifica. *Med Lab* 1999;7:257-66.
- Vernocchi A per il Gruppo di Studio Intersocietario "Marcatori di Lesione Miocardica". Mioglobina: fisiologia e aspetti metodologici. *Med Lab* 1996;4:221-2.
- 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. "Position paper" proposto dal Gruppo di Studio Intersocietario ANMCO-SIBioC-SIMeL "Marcatori di Lesione Miocardica". *Biochim Clin* 1998; 22:516-22.
4. Bonetti G, Pagani F, Panteghini M. Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMeL "Marcatori di Lesione Miocardica". Indagine conoscitiva sull'impiego dei marcatori biochimici di lesione miocardica nei laboratori nazionali. *Biochim Clin* 1998;22:591-3.
 5. NCCLS Proposed Guideline EP6-P. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1986.
 6. NCCLS Approved Guideline EP5-A. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.
 7. NCCLS Proposed Guideline EP7-P. Interference testing in clinical chemistry. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1986.
 8. NCCLS Approved Guideline EP9-A. Method comparison and bias estimation using patient samples. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995.
 9. PetitClerc C, Solberg HE. IFCC approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:639-44.
 10. Solberg HE. IFCC approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:645-56.
 11. Panteghini M, Pagani F. Biological variation of myoglobin in serum. *Clin Chem* 1997;43:2435.
 12. Panteghini M, Pagani F, Bonetti G. I nuovi marcatori biochimici nella valutazione del danno miocardico. *Ligand Assay* 1999;4:2-6.
 13. Dolci A, Vernocchi A, Zaninotto M, Galvani M, et al. per il Gruppo di Studio Interdisciplinare Intersocietario ANMCO-SIBioC-SIMeL "Marcatori di lesione miocardica". I marcatori di danno miocardico. *G Ital Cardiol* 1999;29:739-47.
 14. Ottani F, Galvani M, Panteghini M, Dolci A, et al. per il Gruppo di Studio Interdisciplinare Intersocietario ANMCO-SIBioC-SIMeL "Marcatori di lesione miocardica". Ruolo dei marcatori biochimici di danno miocardico nella pratica clinica: diagnosi di infarto e stratificazione del rischio. *Ital Heart J Suppl* 2000;1:54-64.
 15. Panteghini M on behalf of SIBioC-SIMeL Working Group on 'Markers of cardiac damage'. Biochemical markers of cardiac damage: what is current, what is redundant? *Biochim Clin* 2000;24:431-8.
 16. Panteghini M, Apple FS, Christenson RH, Dati F, et al. Use of biochemical markers in acute coronary syndromes. IFCC Scientific Division, Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:687-93.
 17. Sciacovelli L, Zaninotto M, Plebani M, Panteghini M (per il Gruppo di Studio SIBioC-SIMeL Marcatori di Lesione Miocardica). Il programma nazionale di Valutazione Esterna di Qualità SIBioC-SIMeL per i marcatori di lesione miocardica. *Biochim Clin* 2000;24:285.
 18. Gerhardt W, Nordin G, Herbert AK, Burzell BL, et al. Troponin T and I assays show decreased concentrations in heparin plasma compared with serum: lower recoveries in early than in late phases of myocardial injury. *Clin Chem* 2000;46:817-21.
 19. Krahn J, Parry DM, Leroux M, Dalton J. High percentage of false positive cardiac troponin I results in patients with rheumatoid factor. *Clin Biochem* 1999;32:477-80.
 20. Onuska KD, Hill SA. Effect of rheumatoid factor on cardiac troponin I measurement using two commercial measurement systems. *Clin Chem* 2000;46:307-8.
 21. Stefani F, Bonetti G, Pagani F, Panteghini M. Evaluation of interference effects from heterophilic antibodies (HA) in four commercial platforms for cardiac marker measurement. *Biochim Clin* 2000;24:332.