

Valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T: dalla teoria alla pratica di laboratorio. Documento congiunto del Gruppo di Studio Biomarcatori Cardiovascolari di SIBioC-Medicina di Laboratorio ed European Ligand Assay Society (ELAS)*

Aldo Clerico¹, Martina Zaninotto², Silvia Masotti¹, Veronica Musetti¹, Concetta Prontera¹, Andrea Ripoli¹, Monica Mion², Claudio Passino¹, Mario Plebani²

¹Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio e Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

²Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

ABSTRACT

Evaluation of analytical performance of immunoassay methods for cardiac troponin I and T: from theory to laboratory practice. Joint document of SIBioC and European Ligand Assay Society. All the national and international guidelines recommend that cardiac troponins (cTnI and cTnT) should be considered the preferred biomarkers for the differential diagnosis of acute coronary syndrome (ACS), and also that the 99th upper reference population limit (URL) value for cardiac troponins should be measured with an imprecision ≤ 10 CV%. Indeed, the measurement of the 99th URL of cTnI and cTnT is a very hard analytical challenge due to low biomarker concentrations in healthy subjects. For this reason, only after the year 2006, some manufacturers set up the first new generation of cTnI and cTnT immunoassays with improved analytical sensitivity in accordance with the quality specifications indicated by international guidelines. The most recent international guidelines recommend that immunoassays for cTnI and cTnT measurement, able to completely satisfy these quality specifications, should be defined high-sensitivity methods. These methods should be preferred for early diagnosis of ACS syndrome and also for stratification of cardiovascular risk in both general population and cardiac patients. Therefore, understanding the analytical performance of immunoassay methods for cTnI and cTnT, especially at the low normal concentration range, is critically important for both laboratory professionals and clinicians. The aim of this document is to discuss some theoretical considerations related to the definition of analytical sensitivity, as well as some critical aspects concerning the experimental protocols commonly adopted for evaluation and comparison of analytical performances of cardiac troponin immunoassays.

SCOPO DEL DOCUMENTO

Pochi metodi, attualmente disponibili in commercio, sono in grado di soddisfare del tutto le specifiche di qualità richieste dalle linee guida internazionali per la misura delle troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) (1-9). Di conseguenza, i laboratori clinici non solo devono richiedere e ottenere informazioni sulle caratteristiche analitiche dei metodi per cTnI e cTnT dalle aziende produttrici e distributrici dei sistemi analitici, ma anche essere in grado di valutare e confrontare correttamente i parametri di sensibilità analitica e di riproducibilità dei

differenti metodi. Il compito dei laboratori clinici è particolarmente arduo perché le caratteristiche dei metodi immunometrici per questi analiti sono molto difficili da valutare sperimentalmente, date le basse concentrazioni di cTnI e cTnT circolanti nei soggetti adulti sani, e anche perché la definizione di sensibilità analitica di questi metodi di misura presenta limitazioni teoriche che condizionano lo sviluppo di protocolli sperimentali omogenei di valutazione.

Scopo di questo documento è quello di discutere le criticità presenti sia nella definizione teorica di sensibilità analitica dei metodi immunometrici per la misura delle

*Questo articolo è pubblicato simultaneamente da *Biochimica Clinica* e *Ligand Assay*.

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Medicina di Laboratorio, Fondazione CNR Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Via Trieste 41, 56126 Pisa. Tel. 0503152133, Fax 0503153454, E-mail clerico@ftgm.it

Ricevuto: 06.02.2018

Revisionato: 29.03.2018

Accettato: 03.04.2018

Publicato on-line: 03.05.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.028

troponine cardiache, sia nei protocolli di valutazione e confronto delle caratteristiche dei vari metodi, che sono già disponibili in Italia o lo saranno tra pochi mesi. I dati riportati in questo documento prendono in considerazione solo le evidenze sperimentali che sono state ottenute utilizzando protocolli sperimentali internazionali standardizzati.

INTRODUZIONE

Specifiche di qualità dei metodi di misura delle troponine cardiache

Nell'anno 2000, le linee guida hanno stabilito per la prima volta che cTnI e cTnT dovevano essere considerate come i biomarcatori di elezione per la diagnosi di infarto acuto del miocardio (IMA) (1). Queste linee guida hanno indicato che la concentrazione di cTnI e cTnT corrispondente al 99° percentile della popolazione di riferimento doveva essere considerata come il valore soglia per la diagnosi di IMA (1). Inoltre, le stesse linee guida hanno definito che tale valore decisionale doveva essere misurato con un errore, espresso come coefficiente di variazione (CV), uguale o inferiore al 10% (1). Negli anni successivi, tutte le linee guida nazionali e internazionali hanno sempre confermato queste raccomandazioni, ribadendo i concetti e le definizioni in esse contenute (2-9).

E' evidente che queste specifiche di qualità di fatto assumono che siano presenti nel circolo sanguigno quantità misurabili di cTnI e cTnT, anche nei soggetti sani. Tale evidenza è stata però verificata sperimentalmente solo dopo l'anno 2004 (10-13), quando sono stati messi a punto e resi disponibili per i laboratori clinici, i primi sistemi immunometrici per piattaforme automatizzate con sensibilità analitica ≤ 10 ng/L, che sono stati appunto in grado di misurare le concentrazioni di cTnI e cTnT nella maggior parte dei soggetti in apparente buona salute, comprese le donne adulte e i soggetti in età pediatrica, che generalmente presentano livelli circolanti molto bassi del biomarcatore (14-22).

Dal punto di vista metodologico, è importante rilevare come la messa a punto di metodi che misurino il 99° percentile della popolazione di riferimento (URL) con un errore $\leq 10\%$ sia una sfida molto difficile da vincere, in quanto tale valore può essere stimato entro l'intervallo 15-50 ng/L per la cTnI (Tabella 1) e mediamente di 14 ng/L per la cTnT, considerando i metodi ad alta sensibilità, attualmente disponibili in Italia (11-21).

Utilizzando miocardiociti di ratto, ovini e umani, Marjot J et al. (23) hanno recentemente dimostrato che il valore di URL corrisponde al contenuto di cTnI o cTnT presente in ~ 40 mg di tessuto miocardico, confermando una stima teorica che era stata precedentemente suggerita da altri autori (12). I risultati degli studi più recenti suggeriscono che sono necessarie sensibilità analitiche di ~ 1 ng/L (e forse anche meno) da parte dei metodi immunometrici per raggiungere l'obiettivo ottimale di misurare la concentrazione del biomarcatore con valori superiori al limite di rilevabilità ("limit of detection", LoD) del metodo utilizzato, nel 99% della popolazione generale in apparente buona salute, inclusa l'età pediatrica (12, 13, 18-22). Da un punto di vista clinico, è importante rilevare come la sensibilità analitica dei metodi immunometrici attualmente disponibili per la misura delle troponine cardiache, sia notevolmente superiore al grado di discriminazione e risoluzione spaziale anche delle più recenti tecniche di imaging del tessuto miocardico (24).

Attualmente, sono pochi i sistemi immunometrici, applicati a piattaforme automatizzate, che sono in grado di soddisfare le specifiche di qualità raccomandate dalle linee guida. In accordo con Apple FS et al. (21), è necessario prendere in considerazione due criteri per stabilire se un metodo immunometrico può essere definito ad alta sensibilità analitica (termine derivato dalla definizione in lingua inglese "high sensitivity"). Il primo criterio, che è una *conditio sine qua non*, stabilisce che si definiscono esami di laboratorio ad alta sensibilità analitica per la misura di cTnI e cTnT esclusivamente i metodi immunometrici che sono in grado di misurare l'URL con un errore uguale o inferiore al 10%, come raccomandato da tutte le linee guida nazionali e internazionali. Il secondo criterio stabilisce che i metodi ad alta sensibilità per cTnI e cTnT sono anche in grado di misurare i livelli circolanti delle troponine cardiache con valori superiori al LoD del metodo nella maggioranza dei soggetti adulti in apparente buona salute.

In questo documento verrà utilizzato sempre il termine ad alta sensibilità, che è più simile al termine inglese "high sensitivity", per indicare i metodi per la misura di cTnI e cTnT che soddisfano entrambi i criteri richiesti dalle specifiche di qualità delle linee guida (3, 6-9). Sebbene il termine italiano elevata sensibilità possa essere accettabile dal punto di vista lessicale, sarebbe opportuno che tutti i professionisti di medicina di laboratorio utilizzassero un unico e comune termine per indicare i metodi "high sensitivity", che sono i metodi, e soltanto quelli, che soddisfano entrambi i criteri richiesti dalle

Tabella 1

99° percentile della popolazione di riferimento di tre metodi per la misura della troponina I

| | Metodo ARCHITECT | Metodo Access hs | Metodo ADVIA Centaur hs |
|------------------------------|------------------|------------------|-------------------------|
| Popolazione generale ng/L | 26,2 | 17,5 (12,6-20,7) | 47,34 (36,39-64,27) |
| Femmine ng/L | 15,6 | 11,6 (8,4-18,3) | 36,99 (30,22-72,63) |
| Maschi ng/L | 34,2 | 19,8 (14,0-42,9) | 57,27 (38,58-90,15) |
| Numero di soggetti arruolati | 1531 | 1098 | 2010 |

I valori riportati sono quelli suggeriti dalle aziende produttrici. Tra parentesi sono riportati i limiti di confidenza al 95%.

specifiche di qualità delle più recenti linee guida (21).

I metodi ad alta sensibilità di più recente introduzione sono in grado di misurare i livelli circolanti di cTnI in una percentuale di soggetti normali (inclusa la popolazione pediatrica) significativamente più elevata (18, 19), rispetto ai metodi precedentemente immessi in commercio che misuravano la concentrazione di cTnI (14) o cTnT (15, 16, 25) in ~50-75% della popolazione adulta (20-65 anni) in apparente buona salute. Alcuni autori hanno proposto una classificazione in 4 livelli di sensibilità in dipendenza dalla percentuale di soggetti sani che sono misurabili con i vari metodi (26). Il recentissimo documento della "Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers" di IFCC (27) raccomanda, invece, che il secondo criterio dovrebbe essere diversamente formulato in modo da distinguere la popolazione in relazione al sesso. In accordo con questa formulazione, il secondo criterio prevede che un metodo per cTnI e cTnT ad alta sensibilità debba misurare concentrazioni del biomarcatore superiori al valore di LoD in più del 50% sia in una popolazione di riferimento costituita da soli maschi che in una costituita da sole femmine (27).

In accordo con le più recenti linee guida internazionali (3, 7, 9, 21) i metodi che misurano il 99° percentile della popolazione di riferimento con un errore inferiore al 20% (ma maggiore del 10%) si possono ancora utilizzare nella pratica clinica, ma non si devono definire ad alta sensibilità analitica. I metodi che invece misurano l'URL con un errore maggiore del 20% non dovrebbero più essere utilizzati per la diagnosi di IMA (3, 7). In quest'ultima categoria rientrano quasi tutti i metodi di Point Of Care Testing (POCT), che possono essere utilizzati per un primo screening a letto del paziente, in ambulanza o nei centri di pronto soccorso periferici che non dispongono di un laboratorio clinico. Questi metodi sono pertanto utilizzabili per evidenziare i pazienti ad alto rischio di IMA, allo scopo di avviarli il più velocemente possibile direttamente a un reparto clinico

specializzato in grado di effettuare con urgenza un intervento coronarico invasivo, come raccomandato dalle più recenti linee guida internazionali (9).

Stato dell'arte dei metodi ad alta sensibilità per le troponine cardiache

Attualmente, sono pochi i sistemi immunometrici per cTnI, distribuiti in Italia, che sono in grado di soddisfare entrambi i criteri per essere considerati metodi ad alta sensibilità. Nella Tabella 2 sono riportati i parametri di sensibilità analitica dei metodi per la misura di cTnI e cTnT che sono stati introdotti in Italia in questi ultimi anni (18, 19, 25, 28-30). Come si può notare, la caratteristica principale di questi metodi è quella di presentare valori di sensibilità analitica (espressi in termini di LoD) <10 ng/L. Altro dato essenziale è che il rapporto tra il valore di URL e il valore della concentrazione di troponina, misurata con un errore uguale al 10% (10% del limite di quantificazione; LoQ), deve essere ≥ 1 . È importante rilevare come alcuni recenti metodi per la misura di cTnI presentino valori di questo rapporto tra 4 e 6 (Tabella 2), indicando che il valore decisionale è misurato con errore molto inferiore al 10% (18, 19, 28).

Come esempio, sono riportati in Figura 1 i profili di imprecisione dei metodi per la misura di cTnI con le piattaforme ARCHITECT (Figura 1A) e Access Dxl (Figura 1B) valutati nello stesso laboratorio, utilizzando un protocollo sperimentale accurato e standardizzato (19, 28). Considerando i valori del 99° percentile suggeriti dalle aziende produttrici rispettivamente per il metodo ARCHITECT (26,2 ng/L) e Access (17,5 ng/L) (Tabella 1), queste concentrazioni sono entrambe misurate con un errore di ~5%, cioè la metà del valore di imprecisione richiesto dalle linee guida. Per il metodo ARCHITECT sono disponibili alcuni studi che hanno valutato la distribuzione dei valori di cTnI, misurati con questo metodo in una ampia popolazione sia di soggetti

Tabella 2

Confronto dei parametri di sensibilità analitica dei metodi immunometrici più comuni in Italia per la misura delle troponine I e T, che utilizzano piattaforme automatizzate

| Metodo | LoB (ng/L) | LoD (ng/L) | LoQ 20% CV (ng/L) | LoQ 10%CV (ng/L) | Rapporto* | Riferimento |
|-------------|------------|------------|-------------------|------------------|-----------|-----------------------------|
| cTnI | | | | | | |
| ARCHITECT | 0,7 | 1,3 | 1,8 | 4,7 | 5 | (19) |
| Vidas | 0-1,9 | 1,3-3,2 | 2,9-4,9 | 13,1 | 1,5 | Dati forniti dal produttore |
| Access Dxl | 0,6 | 1,3 | 2,1 | 5,3 | 4 | (27) |
| ADVIA | 1,0 | 2,2 | 3,5 | 8,4 | 5 | (29) |
| AIA | 1,1 | 2,1 | 15,0 | 30,9 | 1 | (28) |
| cTnT | | | | | | |
| ECLIA | 3 | 3-5 | 6 | 13 | 1,3 | (25) |

I valori dei parametri di sensibilità analitica sono stati valutati nello stesso laboratorio utilizzando protocolli standardizzati, mentre i dati che riguardano il metodo che utilizza la piattaforma Vidas sono stati forniti dal produttore.

**Rapporto tra il valore del 99° percentile della popolazione di riferimento suggerito dall'azienda e il valore LoQ 10% CV.*

LoB, limite del bianco; LoD, limite di rilevabilità; LoQ, limite di quantificazione; LoQ 20% CV, valore misurato con un CV >10% e <20%; LoQ 10% CV, valore misurato con un CV <10%.

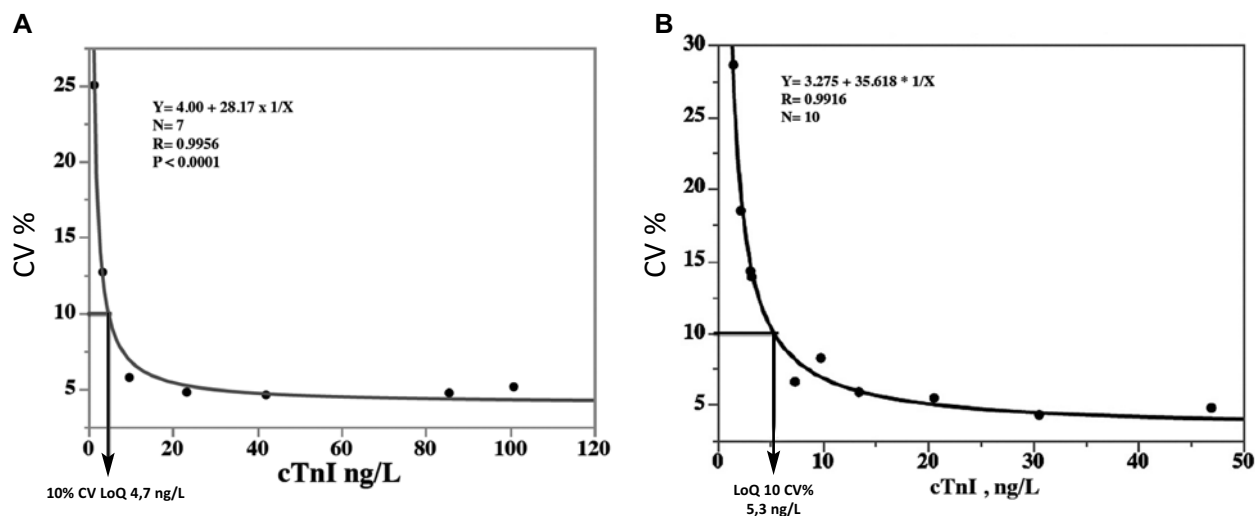


Figura 1

Pannello A: profilo di imprecisione del metodo per il dosaggio della cTnI su ARCHITECT i1000SR (STAT Architect high-sensitivity TnI method, Abbott Diagnostics, Ref. B3P250). Per il calcolo del profilo di imprecisione sono stati utilizzati 7 pool di plasma di soggetti normali e di pazienti cardiopatici che sono stati misurati 40 volte nell'arco di almeno 60 giorni lavorativi con tre differenti lotti di reagenti e calibratori. **Pannello B:** profilo di imprecisione del metodo per il dosaggio della cTnI su piattaforma DXi 800 (Access hsTnI (IUO), REF B52699, Beckman Coulter, Inc. Brea, CA 92821 USA). Per il calcolo del profilo di imprecisione sono stati utilizzati 10 pool di plasma di soggetti normali e di pazienti cardiopatici che sono stati misurati 40 volte nell'arco di almeno 60 giorni lavorativi con due differenti lotti di reagenti e calibratori.

adulti (22) che in età pediatrica (19). Questi dati dimostrano che il metodo ARCHITECT è in grado di misurare concentrazioni di cTnI maggiori del LoD rispettivamente in più del 90% della popolazione adulta e in più del 85% della popolazione in età pediatrica in apparente buona salute (19, 22). Purtroppo, attualmente, vi sono pochi dati sulla distribuzione delle concentrazioni del biomarcatore misurate su ampie popolazioni di individui apparentemente sani con la maggior parte dei metodi per cTnI distribuiti in Italia (28-30). Per questo motivo, non vi sono ancora sufficienti evidenze sperimentali per definire ad alta-sensibilità questi metodi più recenti (20-22).

In questi ultimi anni si può certamente affermare come vi sia stato un miglioramento costante e progressivo delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura di cTnI e cTnT, come pure una riduzione delle differenze sistematiche tra le misurazioni. Infatti, in uno studio del gruppo di lavoro IFCC, pubblicato nel 2004 (10), nessun metodo allora in commercio o in corso di studio riusciva a soddisfare le specifiche di qualità raccomandate dalle linee guida internazionali e, inoltre, vi era una differenza fino a 20 volte tra i valori decisionali riportati per i differenti metodi di cTnI e cTnT. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato come persistano ancora sia differenze sistematiche tra i valori misurati di cTnI, che nelle caratteristiche analitiche tra i metodi di misura di cTnI e cTnT (13, 20-22, 26, 31). I valori riportati in Tabella 1 evidenziano come sia tuttora presente una differenza tra i valori del 99° percentile della popolazione di riferimento dei diversi metodi fino a circa due volte.

Risulta, quindi, opportuno discutere in dettaglio le problematiche e le difficoltà metodologiche che

riguardano la valutazione accurata sia dei parametri di sensibilità analitica, che il calcolo dell'URL.

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI SENSIBILITÀ ANALITICA: DALLA TEORIA ALLA PRATICA

Bianco del metodo e stima del parametro limite del bianco

I fondamenti teorici su cui si basa la valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura sono discussi in dettaglio nel documento dell'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) del 1995 (32). In particolare, questo documento specifica che il valore determinato dal segnale chimico-analitico (LoD) deve essere distinto dal rumore di fondo. Questi fondamenti teorici sono stati poi recepiti da tutti i documenti e protocolli successivi (33-35) e discussi in dettaglio da molti Autori (36-39).

Considerando il caso particolare di un metodo immunometrico che utilizza una piattaforma automatizzata, il rumore di fondo può essere assimilato al concetto di bianco del metodo, che corrisponde al valore che è misurato dal sistema in un campione in cui non è presente l'analita (32, 34, 36). La Figura 2 illustra il significato statistico-matematico dei parametri di sensibilità correntemente denominati LoB e LoD ("limit of blank" e "limit of detection" della lingua inglese) in accordo con i documenti ISO e IUPAC (32, 33). In particolare, la Figura 2 mostra come il valore critico (LC) possa essere considerato una valida stima del valore di LoB, cioè del bianco del metodo. Il valore di LoB, infatti, corrisponde alla concentrazione dell'analita che può

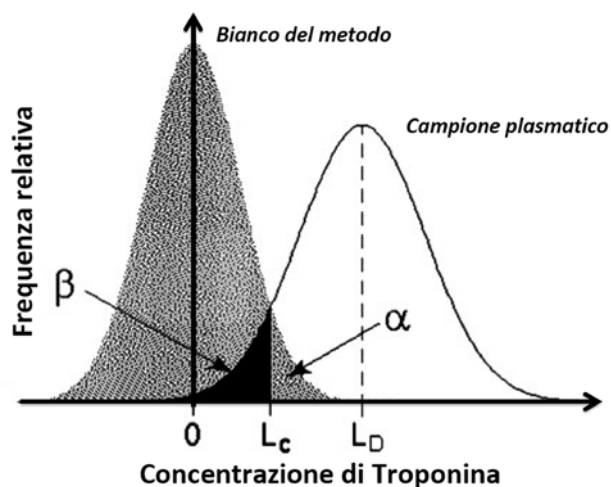


Figura 2

Relazione teorica tra il valore del bianco (LoB) e quello del limite di rilevabilità (LoD) secondo la definizione IUPAC e ISO (32, 33). Il livello critico (LC) è il valore di LoB, che corrisponde al 95° percentile della distribuzione dei valori del bianco misurati dal metodo. Il valore di rilevabilità (LD) corrisponde al valore di LoD, che è calcolato con la formula: $LoB + 1,645 DS$. Solo se le deviazioni standard delle distribuzioni dei valori misurati del bianco del metodo e del campione plasmatico con concentrazione nulla di troponina sono uguali, LC corrisponde contemporaneamente al 95° percentile della distribuzione dei valori misurati del bianco del metodo (area punteggiata, alfa) e al 5° percentile della distribuzione dei valori misurati nel campione plasmatico (area colorata in nero, beta) (39). Se, l'assunzione di omoschedasticità non è soddisfatta, come generalmente avviene nella pratica, LoB non risulta uguale ma soltanto si approssima al 5° percentile della distribuzione dei valori misurati nel campione plasmatico.

essere distinta con una probabilità uguale a α (Figura 2) dal valore 0 (bianco del metodo). Generalmente la probabilità viene scelta con un valore di $P=0,05$. Considerando il caso particolare dei metodi per la misura delle troponine cardiache, il parametro di sensibilità LoB può essere quindi definito (ipotesi nulla) come la più elevata apparente concentrazione di troponina cardiaca che non può essere distinta dalla concentrazione 0 (32, 34, 36). In pratica, il calcolo del valore LoB di un metodo immunometrico per la misura delle troponine cardiache si ottiene dalla formula seguente

$LoB (ng/L) = \text{valore medio del bianco del metodo (ng/L)} + 1DS$ della distribuzione dei valori del bianco del metodo moltiplicato per 1.645 (deviata standardizzata corrispondente a un probabilità di 0,05 in una direzione) (34, 36).

Sfortunatamente, non è sempre semplice scegliere nella pratica corrente, quando si utilizzano sistemi immunometrici applicati su piattaforme automatizzate, il campione più adatto da utilizzare come bianco del metodo per determinare il valore LoB. Quando l'azienda produttrice mette a disposizione i materiali per la calibrazione del sistema immunometrico, includendo il calibratore 0 (che presenta appunto una concentrazione dell'analita uguale a 0), questo può essere considerato come bianco del metodo. Purtroppo, è però sempre più frequente da parte delle aziende produttrici la pratica di non fornire agli utilizzatori gli standard necessari per la calibrazione del metodo immunometrico. Tuttavia, vi è comunque sempre la possibilità di una valutazione della curva di calibrazione che il sistema utilizza per calcolare i valori di cTnI e cTnT nei campioni clinici.

Come esempio, nella Figura 3A è rappresentata la

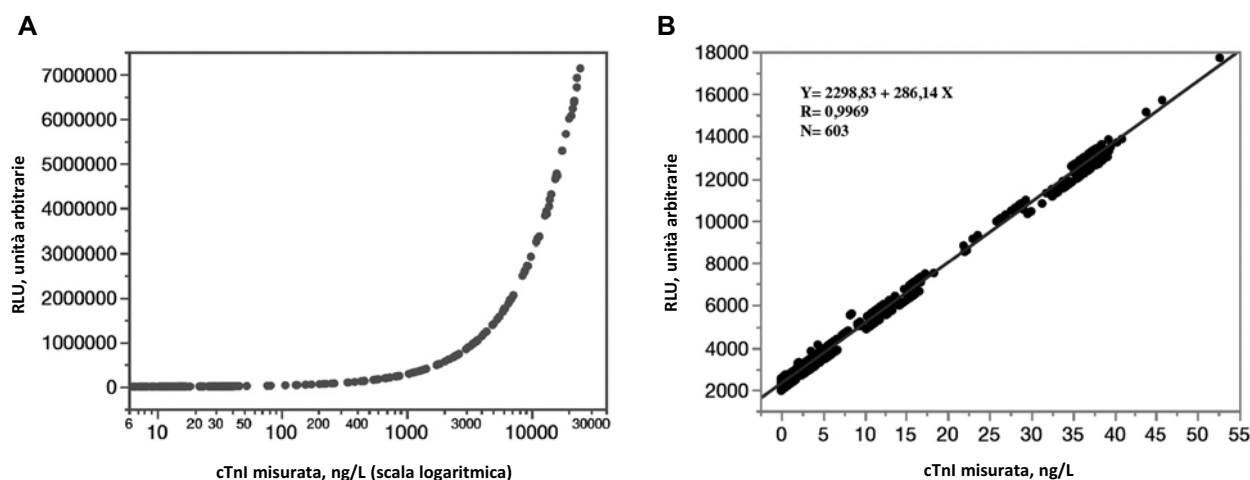


Figura 3

Pannello A: relazione non lineare tra la concentrazione misurata di cTnI e il segnale chemiluminescente (espresso come Relative Luminescence Units, RLU,) per il metodo ADVIA Centaur TNIH su Centaur XPT (Siemens Healthineers Diagnostics). Sono rappresentati in figura i risultati della misura di 734 campioni di plasma di soggetti normali e di pazienti con malattie cardiovascolari, inclusi alcuni con infarto del miocardio, ottenuti nell'arco di circa tre mesi utilizzando due differenti lotti di materiali e calibratori. Pannello B: relazione lineare tra la concentrazione misurata di cTnI (asse delle ascisse) e il segnale chemiluminescente (espresso come RLU, asse delle ordinate) per il metodo ADVIA Centaur TNIH su Centaur XPT (Siemens Healthineers Diagnostics), prendendo in considerazione 603 campioni di soggetti normali e di pazienti cardiopatici con valori di cTnI inferiori a 60 ng/L. Utilizzando i parametri di questa regressione lineare si può stimare il valore di LoB del metodo come descritto in dettaglio nel testo.

relazione tra i valori misurati di cTnI (sull'asse delle ascisse, in ng/L), che coprono l'intero arco delle concentrazioni misurabili dell'analita, e i relativi valori del segnale dello strumento (sull'asse delle ordinate, come "Relative Luminescence Units", RLU), che sono parametri sempre disponibili come dati nel programma dei sistemi immunometrici che utilizzano le più comuni piattaforme automatizzate. La regressione, riportata nella Figura 3A, è stata ottenuta misurando molti campioni di soggetti normali e pazienti con malattie cardiache nell'arco di 60 giornate lavorative utilizzando più lotti di materiali e di calibratori. La regressione rappresenta, quindi, una valida stima della curva di calibrazione media utilizzata dal metodo immunometrico per calcolare i valori di cTnI nei campioni, nell'arco di tempo considerato. In particolare, si può prendere in considerazione la parte della curva di calibrazione che corrisponde a valori di campioni con basse concentrazioni di cTnI (ad esempio tra 0 e 50 ng/L) (Figura 3B). Questa relazione tra i valori di cTnI misurati (in ascisse) e i valori di RLU (in ordinata) risulta lineare e fornisce una stima realistica del valore medio del bianco del metodo (come RLU, stimato dalla intercetta sull'asse delle ordinate della retta). In questo caso, si potrà verificare, misurando più volte tale calibratore 0 nell'arco di più giorni lavorativi (Figura 4), che il valore medio trovato, espresso in RLU, sarà non significativamente differente dal valore di RLU stimato con la retta di regressione riportata in Figura 3B.

Purtroppo, non è sempre possibile per l'utilizzatore avere a disposizione un calibratore 0, che funga da bianco del metodo, e quindi, in pratica, si utilizza un campione che abbia un valore, espresso in RLU, simile a quello stimato dalla regressione riportata nella Figura 3B. In questo caso, possono fungere come valido sostituto del bianco del metodo una soluzione tampone, meglio se corretta con l'aggiunta di albumina bovina in concentrazione simile a quella proteica del plasma umano (preparata *ad hoc* in laboratorio), la soluzione eluente o di lavaggio del sistema immunometrico fornita dalla azienda produttrice, oppure campioni plasmatici di soggetti con valori molto bassi del biomarcatore.

Nell'esempio sopra considerato, si può osservare come il valore medio misurato del bianco del metodo (calibratore 0), espresso in RLU (media=2299,99; DS=174,62; N=72) (Figura 4) è, di fatto, non significativamente differente dal valore 0 di cTnI stimato dalla regressione lineare riportata nella Figura 3B (in media 2298,83 RLU) e mostra anche una distribuzione assimilabile a una curva normale, come richiesto dalla teoria (32, 33). Considerando la regressione lineare riportata in Figura 3B, è possibile calcolare i valori di concentrazione (in ng/L) corrispondenti a 72 misure del calibratore 0 (media=0,004 ng/L, DS=0,6102) e, di seguito, anche il valore LoB del metodo considerato con la formula sopra riportata: $\text{LoB (ng/L)} = \text{media bianco del metodo (ng/L)} + \text{DS bianco del metodo (0,6102 ng/L)} \times 1,645 = 0 + 0,61 \times 1,645 = 1,00 \text{ (ng/L)}$.

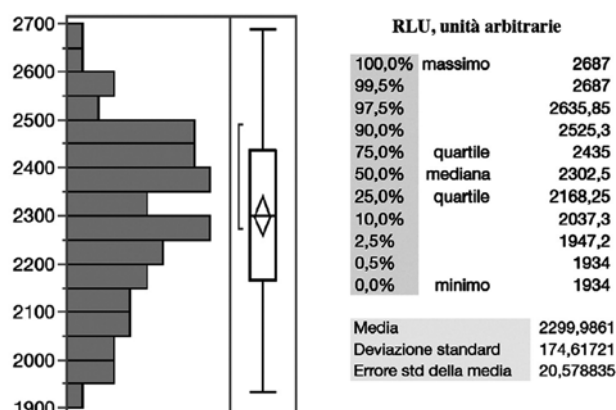


Figura 4

Distribuzione dei valori (espressi come RLU) del calibratore 0 del metodo ADVIA Centaur TNIH applicato su Centaur XPT. Questo calibratore (considerato come bianco del metodo) è stato misurato in 72 differenti sessioni in un arco di tempo di più di 60 giorni lavorativi utilizzando due differenti lotti di reagenti e calibratori.

Stima del parametro LoD

Il valore LoD è generalmente definito come la più piccola concentrazione di troponina cardiaca che può essere realmente distinta dal valore LoB (32-38) (Figura 2). In pratica, il valore LoD può essere calcolato come segue:

$$\text{LoD (ng/L)} = \text{LoB (ng/L)} + \text{DS} \times 1,645$$

dove DS indica la deviazione standard di un campione, misurato più volte, di un soggetto con valore di troponina molto vicino al valore LoB (34, 36) (Figura 2). Considerando l'esempio precedente, dopo aver misurato un campione di un soggetto con un valore di cTnI molto basso (media 0,51 ng/L, DS 0,70, N=45), il valore LoD risulta: $\text{LoB (1,0 ng/L)} + (1,645 \times 0,70) = 1,0 + 1,15 = 2,15 \text{ ng/L}$.

È interessante osservare che se il valore stimato del bianco del metodo è uguale o molto vicino a 0 e i valori delle deviazioni standard del bianco del metodo e del campione sono uguali (come assunto dalla teoria) (32, 38), il parametro LoD risulta esattamente uguale a 3,29 ($2 \times 1,645$) volte il valore di DS del parametro LoB. In accordo con questa osservazione, il valore calcolato come LoD ha una probabilità uguale a 0,001 di non essere diverso dal valore del bianco del metodo (assunto uguale a 0 ng/L di troponina). Questa osservazione spiega anche perché generalmente il parametro LoD risulta molto simile a due volte il parametro LoB.

È importante sottolineare che la relazione tra LoB e LoD, come riportato nella Figura 2, richiede che le DS delle distribuzioni dei valori di troponina misurate rispettivamente nel bianco del metodo e nel campione plasmatico siano uguali (condizione di omoschedasticità) (32, 38). Infatti, solo se questa assunzione è soddisfatta, si può dimostrare che il valore

critico (L_C , parametro LoB) rappresenta contemporaneamente sia il limite inferiore dell'errore del I tipo (falsi positivi, area α della Figura 2), che il limite superiore dell'errore del II tipo (falsi negativi, area β nella Figura 2) (31). In particolare, il primo test (calcolo del valore di LoB) ha come ipotesi nulla che la troponina non è presente nel bianco del metodo, mentre il secondo (calcolo del valore di LoD) che la troponina non è presente a una certa concentrazione (valore del bianco del metodo) in un campione con bassi valori del biomarcatore (39). Si può, quindi, incorrere nell'errore di tipo I, se si misura un valore di troponina significativamente diverso da 0 (cioè $>L_C$), quando l'analita è assente (falso positivo), oppure, rispettivamente, nell'errore di tipo II, se si misura un valore non significativamente differente da 0 (cioè $<L_C$), quando la troponina è presente nel campione (falso negativo) (Figura 2) (32). Purtroppo questa fondamentale condizione di omoschedasticità risulta del tutto arbitraria, perché di fatto non è mai soddisfatta in pratica (38).

Un'altra osservazione, molto rilevante dal punto di vista della pratica clinica, è che il valore LoD di un metodo immunometrico per le troponine cardiache (in ng/L), ha 999 probabilità su 1000 ($p=0,001$) di essere considerato differente dal valore LoB (assunto uguale a 0 ng/L). Se invece, il valore di LoD è utilizzato nella pratica clinica come limite inferiore dell'intervallo di misura del metodo di dosaggio, in accordo con la sua definizione di LoD , ha solamente 50 probabilità su 100 ($p=0,50$) di essere considerato un valore misurabile (37). Questa osservazione sembra però in contrasto con alcuni recenti risultati che hanno indicato che anche valori di troponina compresi tra i valori LoB e LoD di un metodo immunometrico possono presentare un rilevante significato clinico (soprattutto prognostico), suggerendo che sono necessari ulteriori approfondimenti sulle considerazioni teoriche che riguardano la definizione di LoB e LoD (40-45).

CONSEGUENZE PRATICHE DELLE ASSUNZIONI TEORICHE RELATIVE ALLA DEFINIZIONE DI SENSIBILITA' ANALITICA

Molto si è discusso, anche recentemente, tra gli esperti del settore, sulle assunzioni teoriche che la definizione IUPAC/ISO sulla nomenclatura relativa alla valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura (32, 33) richiede e sulle loro possibili conseguenze pratiche, in particolare quando queste definizioni si applicano ai metodi ad alta sensibilità per la misura delle troponine cardiache (37, 40, 41, 43, 44). Risulta, infatti, evidente che per stabilire se un metodo è ad alta sensibilità si deve trovare un consenso tra gli esperti su una definizione e una procedura analitica, entrambe rigorose, che permettano di stabilire senza ambiguità se i sistemi immunometrici effettivamente posseggono queste specifiche di qualità. Inoltre, sembra anche ragionevole supporre che i metodi definiti

ad alta sensibilità, siano caratterizzati non solo da migliori caratteristiche analitiche, ma anche da una migliore accuratezza diagnostica e prognostica nella pratica clinica (27). Infatti, la scelta di utilizzare nella pratica clinica metodi che sono più costosi e anche di più difficile interpretazione clinica, come lo sono certamente i metodi definiti ad alta sensibilità rispetto a quelli della precedente generazione, è considerata accettabile solo se i nuovi metodi sono in grado di presentare un bilancio positivo tra costi e benefici (46). In particolare, i metodi immunometrici ad alta sensibilità per cTnI e cTnT, per avere un buon rapporto costo/beneficio, dovrebbero consentire di effettuare più rapidamente e/o in modo più accurato, diagnosi e prognosi in pazienti con sospetto di malattie cardiovascolari.

Una preliminare e generale considerazione deve essere tenuta ben presente prima di affrontare e confrontare l'utilità dei vari parametri di sensibilità analitica nella classificazione dei metodi ad alta sensibilità per la misura di cTnI e cTnT. Deve essere ricordato che si ha comunque sempre una perdita di informazione significativa e quindi un costo da pagare, quando una variabile continua (come la misura delle cTnI e cTnT) viene utilizzata in test statistici per la diagnosi o la prognosi come una variabile dicotomica, utilizzando un valore decisionale (44, 47). Ad esempio è ben noto che l'utilizzo della mediana della distribuzione dei valori della variabile continua, comporta in alcuni test statistici non solo la perdita di una rilevante parte di informazione dei dati (e quindi di perdita di potenza statistica), ma anche, dal punto di vista clinico, un possibile aumento dei falsi positivi, come pure una sottostima degli eventi in una analisi di regressione tra gruppi (47). Analogamente, l'utilizzo di un limite decisionale, corrispondente ai valori di LoB , LoD o LoQ , è sicuramente una semplificazione necessaria in alcuni contesti clinici, ma comporta delle limitazioni rilevanti, che i laboratoristi e i clinici dovrebbero conoscere e tenere ben presenti quando questi parametri vengono utilizzati negli algoritmi diagnostici e prognostici.

Altre limitazioni sono inerenti alla teoria stessa della definizione di sensibilità analitica del documento IUPAC del 1995 (32). La Figura 2 rappresenta schematicamente la relazione che esiste tra i valori di LoB e LoD in accordo con la definizione IUPAC/ISO (32, 33). Nella figura è riportato il caso particolare in cui la concentrazione media dei valori di troponina, misurata nel campione che costituisce il bianco del metodo sia uguale a 0 ng/L. Il valore, indicato come L_C corrisponde quindi al valore di LoB , mentre il valore indicato come L_D , corrisponde al valore di LoD . Purtroppo, nella pratica del laboratorio clinico è improbabile che le DS dei valori del bianco del metodo e del campione di soggetti con bassa concentrazione di troponina siano uguali, in quanto il bianco del metodo mostra una concentrazione media minore di quella dei campioni di soggetti normali. E' ben noto che vi è una regressione lineare positiva tra i valori delle concentrazioni misurate dell'analita e i rispettivi valori di DS (37, 48). Ad esempio, in Figura 5

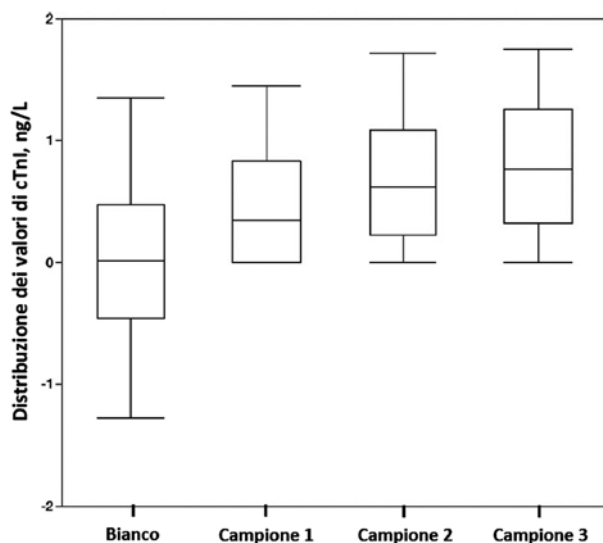


Figura 5

Distribuzione dei valori (box plot) di cTnI misurati con il metodo ADVIA Centaur TNIH che utilizza la piattaforma Centaur XPT, del calibratore 0 (bianco del metodo) e di tre campioni di plasma di soggetti normali con concentrazioni del biomarcatore inferiori a 2 ng/L.

sono riportate rispettivamente le distribuzioni dei valori di cTnI del bianco e di quella di 3 campioni plasmatici di soggetti normali con valori molto bassi dell'analita che però presentano valori di DS tutti significativamente più elevati ($p < 0,0001$) rispetto a quelli del bianco del metodo (media campione 1: 0,51 ng/L, DS: 0,70; media campione 2: 0,69 ng/L, DS: 0,59; media campione 3: 0,82 ng/L, DS: 0,59; $N=45$). Non essendo quasi mai soddisfatta l'assunzione che il bianco del metodo e il campione plasmatico abbiano valori di varianza uguali (condizione detta di omoschedasticità), come richiesto dalla definizione IUPAC/ISO (32, 38, 39), non esiste un solo valore critico LC (Figura 2) che rappresenti nello stesso tempo il 95° percentile della distribuzione dei valori del bianco del metodo e il 5° percentile della distribuzione dei valori del campione plasmatico. I due percentili hanno bensì valori distinti, e quindi non sono più valide le assunzioni teoriche alla base della definizione IUPAC/ISO (32, 38, 39). Per questo motivo, si cerca di utilizzare per la valutazione del parametro LoD un campione che abbia una varianza dei valori misurati di troponina molto simile a quella del bianco del metodo, come nell'esempio considerato.

Date queste limitazioni teoriche e le difficoltà sperimentali osservate nella valutazione dei valori di LoB, alcune linee guida hanno suggerito di utilizzare anche i valori di LoQ per stimare più accuratamente le caratteristiche analitiche dei metodi immunometrici per la misura di cTnI e cTnT (20, 21, 49). Tuttavia, l'utilizzo del valore LoQ presenta a sua volta sia limitazioni teoriche che criticità a livello sperimentale, che meritano una discussione più approfondita (22, 45).

VALUTAZIONE DEL LIMITE DI QUANTIFICAZIONE COME PARAMETRO DI SENSIBILITÀ ANALITICA

L'utilizzo del valore LoQ (espresso come CV al 20%) per stimare la sensibilità analitica, deriva storicamente dagli studi del gruppo di Spencer CA et al. (50) sull'importanza clinica delle caratteristiche analitiche dei metodi immunometrici di dosaggio della tirotropina. Questi Autori hanno suggerito per primi di definire sensibilità funzionale il valore LoQ al 20% CV, appunto per porre l'accento sulla capacità di questo parametro di legare insieme la riproducibilità e la sensibilità analitica del metodo con l'interpretazione clinica del risultato in pazienti con malattie tiroidee (50).

Nel 2017 la Food and Drug Administration statunitense (FDA) (51) ha approvato il metodo per la misura della cTnT (Elecsys Troponin T Gen 5 STAT, Roche Diagnostics) per la diagnosi di IMA suggerendo come limite inferiore dell'intervallo di misura il valore LoQ al 20% CV (6 ng/L), piuttosto che il parametro LoD (3-5 ng/L) (Tabella 2), come invece raccomandato dal documento EP17-A (32) del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) e dalle più recenti linee guida sull'utilizzo dei metodi di misura di cTnI e cTnT per la diagnosi della sindrome coronarica acuta (27, 52).

Come evidenziato dai dati riportati in Tabella 2, il parametro LoQ al 20% CV presenta generalmente un valore di concentrazione di troponina maggiore del parametro LoD. Inoltre, il parametro LoQ presenta un CV molto minore rispetto ai valori di LoD e LoB in quanto l'errore analitico (asse delle ordinate) aumenta esponenzialmente tendendo all'infinito, quando il valore di cTnI tende a 0 (asse delle ascisse) (Figura 1 e Figura 2).

Se si prendono in considerazione i parametri di sensibilità analitica del metodo ECLIA per la cTnT (Tabella 2) si nota che il valore LoQ al 10% CV (13 ng/L) è simile all'URL (14 ng/L), mentre il valore LoQ al 20% CV (6 ng/L) è molto vicino ai valori del parametro LoD (valori compresi tra 3 e 5 ng/L a seconda della tipologia del metodo). Per contro, i metodi per la misura della cTnI mostrano risultati non omogenei. Tuttavia, i metodi immunometrici con le caratteristiche analitiche migliori (come ARCHITECT, Access DxI e ADVIA) mostrano valori del parametro LoQ 20% CV, valutati nel medesimo laboratorio con gli stessi protocolli standardizzati, molto più vicini al LoD (con una differenza di ~1-2 ng/L) che al valore del parametro LoQ 10% CV (differenza >3 ng/L). Inoltre, questi metodi presentano valori più elevati del rapporto tra il valore dell'URL e il valore del parametro LoQ 10% CV, indicando che questi metodi misurano il valore decisionale per la diagnosi di IMA con una imprecisione eccellente (compresa tra il 4% e il 6%, cioè circa la metà di quella richiesta dalle linee guida internazionali). Considerando quindi i dati riportati nella Tabella 2, la scelta di utilizzare un limite inferiore

dell'intervallo di lavoro uguale al parametro LoQ 20%CV (come suggerito dalla FDA per il metodo ad alta sensibilità per cTnT) piuttosto che il parametro LoD, come suggerito dal protocollo CLSI EP17-A (34) e da alcune recenti linee guida (27, 52) potrebbe sembrare accettabile per il metodo ECLIA per la cTnT, ma forse meno opportuno per i metodi per cTnI, che presentano le migliori caratteristiche analitiche.

Un indubbio vantaggio di utilizzare il parametro LoQ 20% CV è che l'errore analitico per la misura di questo valore risulta di fatto uguale per tutti i metodi, mentre il valore di LoD mostra una variabilità più elevata (generalmente $\geq 30\%$ CV), con un errore di misura che per alcuni metodi, con caratteristiche analitiche inferiori, risulta molto elevato. Inoltre, come abbiamo discusso nei precedenti paragrafi, il calcolo dei valori di LoB e di LoD presenta delle limitazioni teoriche, come pure notevoli difficoltà sperimentali. Per contro, la definizione del profilo di imprecisione non presenta limitazioni teoriche e l'approccio sperimentale può essere standardizzato (34, 50). Di conseguenza, bisogna valutare per ciascun metodo, usando protocolli sperimentali designati *ad hoc* e test statistici specifici e di potenza adeguata, quale sia il più valido indice da utilizzare come limite inferiore dell'intervallo di lavoro tra il valore di LoD o LoQ 20% CV.

Dal punto di vista clinico, recenti evidenze hanno dimostrato che il rischio cardiovascolare aumenta progressivamente con la concentrazione di troponina (specialmente se misurata con metodi ad alta sensibilità), anche per valori compresi nell'intervallo di concentrazioni di troponina dei soggetti apparentemente sani e che, quindi, presentano livelli circolanti del biomarcatore al di sotto dell'URL (53-63). Questi dati suggeriscono che nei metodi di dosaggio delle troponine ad alta sensibilità, conviene utilizzare un limite inferiore dell'intervallo di misura al livello più basso possibile, quindi il parametro LoD (se non addirittura LoB) invece del LoQ 20% CV. Tuttavia sono necessari studi clinici designati *ad hoc* per dimostrare questa ipotesi.

DOVE SIAMO E DOVE POSSIAMO ANDARE

E' prevedibile che il cammino teso al miglioramento delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura di cTnI e cTnT proseguirà anche nei prossimi anni fino a raggiungere per la maggior parte dei sistemi immunometrici, il traguardo di misurare i livelli circolanti del biomarcatore in praticamente tutti i soggetti sani, comprese le donne e individui in età pediatrica, con valori al di sopra del limite di rilevazione del metodo (12, 21, 22, 26).

In particolare, confrontando le caratteristiche analitiche dei metodi di misura di cTnI e cTnT dal 2004 (10) fino ai tempi più recenti (21, 28-31) (Tabella 2) si nota come si sia notevolmente ridotta la differenza tra il valore del parametro LoQ 10 % CV, che è l'errore richiesto dalle linee guida per misurare l'URL, e i rispettivi valori dei parametri LoB o LoD. Come discusso in dettaglio in un recente documento della Sezione Italiana dell'European Ligand Assay Society (ELAS)

(64), la sensibilità analitica di un metodo immunometrico non dipende solo dal sistema di rilevazione del segnale analitico, ma anche dalle proprietà della relazione che si instaura tra il legando (nel caso specifico la cTnI o cTnT) presente nel campione da misurare e il sistema legante del metodo. Infatti, man mano che la concentrazione dell'analita del campione diminuisce, le interferenze (sia specifiche che aspecifiche) tendono a perturbare con una forza progressivamente crescente il legame specifico tra l'analita e il sistema legante, diminuendo così la capacità del sistema immunometrico di discriminare tra la vera concentrazione dell'analita e il rumore di fondo (64). Questo fenomeno è particolarmente importante per quegli analiti che sono presenti nel plasma umano in concentrazione di ng/L (o inferiori), come cTnI e cTnT. E' importante sottolineare che questo effetto è tipico di tutti i metodi di misura che utilizzano un sistema legante per determinare l'analita e quindi non si dovrebbe verificare nei metodi di misura che utilizzano tecniche analitiche differenti, come ad esempio i metodi di misura basati sulla spettrometria di massa. Purtroppo, almeno al momento, non esistono metodi di misura alternativi ai metodi immunometrici, utilizzabili nel laboratorio clinico, per cTnI e cTnT.

Il già citato documento della "Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers" di IFCC (27) suggerisce la necessità che i laboratori clinici, valutino tutti i parametri di sensibilità analitica (cioè: LoB, LoD e LoQ). Questo documento (27) raccomanda, quindi, che le aziende produttrici dei materiali per il controllo di qualità mettano a disposizione di tutti i laboratori dei campioni di controllo che siano commutabili con i campioni di soggetti sani e di pazienti con malattie cardiovascolari, e che presentino concentrazioni di cTnI e cTnT nell'intervallo riscontrato nei soggetti normali, comprese concentrazioni molto basse, in modo da poter valutare accuratamente i valori di LoB e LoD. Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato che è possibile preparare campioni di controllo commutabili con i campioni di soggetti normali e di pazienti cardiopatici con valori molto bassi di cTnI e cTnT (31). I risultati di nostri studi ancora più recenti, che riguardano il confronto tra i metodi di misura di cTnI recentemente introdotti in commercio in Italia (19, 28-30), dimostrano che è possibile preparare dei pool di plasma di soggetti normali con concentrazioni molto basse di cTnI e cTnT, che possono essere quindi utilizzati per valutare accuratamente il profilo di imprecisione e i valori dei parametri LoB e LoD.

CONCLUSIONI

Fin dall'anno 2000 la misura di cTnI e cTnT è stata raccomandata come la strategia di scelta per la diagnosi differenziale di IMA da tutte le linee guida nazionali e internazionali (1-9). Numerose evidenze sperimentali, che si sono accumulate in questi ultimi anni, dimostrano come progressivi incrementi di cTnI e cTnT, anche nell'intervallo di concentrazioni del biomarcatore considerate normali, sono significativamente associati a

un aumento sia di eventi cardiovascolari avversi che di mortalità (27, 49, 65).

Questi risultati sperimentali non si sarebbero potuti produrre senza l'utilizzo di metodi di misura per cTnl e cTnT che presentano caratteristiche tipiche di metodi ad alta-sensibilità. Tuttavia, l'utilizzo di questi metodi ha evidenziato come molti aspetti della degradazione intracitoplasmatica, del rilascio dal miocardiocita e del turnover periferico di cTnl e cTnT, sia nei soggetti normali (a riposo come pure durante sforzo fisico intenso) che nei pazienti con cardiomiopatie, non siano ancora ben noti (65).

Da un punto di vista fisiopatologico, la misura di cTnl e cTnT non può dimostrare la causa dell'aumentato rilascio del biomarcatore dal miocardiocita, cioè se questo sia dovuto a danno reversibile, ad apoptosi oppure a necrosi del miocardiocita. D'altra parte, l'elevata sensibilità analitica degli attuali metodi di misura di cTnl e cTnT è superiore al potere discriminante delle più recenti e sofisticate tecniche di imaging applicate al sistema cardiovascolare (12, 23, 65). Per questo motivo tutte le linee guida più recenti sottolineano come sia necessaria da parte dei clinici un'attenta valutazione di tutti i casi in cui vi sia un aumento progressivo delle concentrazioni circolanti di cTnl e cTnT, anche quando si riscontri all'anamnesi un'apparente assenza di condizioni cliniche responsabili del danno (27, 49, 65).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Alpert JS, Thygesen K, Antman E, et al. Myocardial infarction redefined: a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959-69.
- Thygesen K, Alpert JS, White HD. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2173-95.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for universal definition of myocardial infarction. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1581-98.
- Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007;53:552-74.
- Apple FS, Jesse RL, Newby LK, et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007;53:547-51.
- Thygesen K, Mair J, Katus H, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010;31:2197-204.
- Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012;33:2252-7.
- Casagrandi I, Cavazza M, Clerico A, et al. Proposal for the use in emergency departments of cardiac troponins measured with the latest generation methods in patients with suspected ACS without persistent ST-segment elevation. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1727-37.
- Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
- Panteghini M, Pagani F, Yeo KTJ, et al. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem* 2004;50:327-32.
- Clerico A, Fortunato A, Ripoli A, et al. Distribution of plasma cardiac troponin I values in healthy subjects: pathophysiological considerations. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:804-8.
- Giannoni A, Giovannini S, Clerico A. Measurement of circulating concentrations of cardiac troponin I and T in healthy subjects: a tool for monitoring myocardial tissue renewal? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1167-77.
- Apple FS, Ler R, Murakami MM. Determination of 19 cardiac troponin I and T assay 99th percentile values from a common presumably healthy population. *Clin Chem* 2012;58:1574-81.
- Prontera C, Fortunato A, Storti S, et al. Evaluation of analytical performance of the Siemens ADVIA Tnl Ultra Immunoassay. *Clin Chem* 2007;53:1722-3.
- Jarausch J, Braun S, Dolci A, et al. Evaluation of a development version of the Elecsys highly sensitive troponin T assay. *Clin Chem* 2008;54(Suppl. 6):A91.
- Saenger AK, Beyrau R, Braun S, et al. Multicentre analytical evaluation of a high-sensitive troponin T assay. *Clin Chim Acta* 2011; 412:748-54.
- Venge P, James S, Jansson L, et al. Clinical performance of two highly sensitive cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 2009;55:109-16.
- Krintus M, Kozinski M, Boudry P, et al. European multicenter analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT STAT highly sensitive troponin I immunoassay. *Clin. Chem Lab Med* 2014;52:1657-65.
- Caselli C, Cangemi G, Masotti S, et al. Plasma cardiac troponin I concentrations in healthy neonates, children and adolescents measured with a highly sensitive immunoassay method: highly sensitive troponin I in pediatric age. *Clin Chim Acta* 2016;458:68-71.
- Sandoval Y, Apple FS. The global need to define normality: the 99th percentile value of cardiac troponin. *Clin Chem* 2014;60:455-62.
- 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.
- Clerico A, Zaninotto M, Ripoli A, et al. The 99th percentile of reference population for cTnl and cTnT assay: methodology, pathophysiology and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
- Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. *Clin Chem* 2017;63:990-6.
- Barison A, Grigoratos C, Todiere G, et al. Myocardial interstitial remodelling in non-ischaemic dilated cardiomyopathy: insights from cardiovascular magnetic

- resonance. *Heart Fail Rev* 2015;20:731-49.
25. Franzini M, Lorenzoni V, Masotti S, et al. The calculation of the cardiac troponin T 99th percentile of the reference population is affected by age, gender, and population selection: a multicenter study in Italy. *Clin Chim Acta* 2015;438:376-81.
 26. Apple FS. A new season for cardiac troponin assays: It's time to keep a scorecard. *Clin Chem* 2009;55:1303-6.
 27. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, 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 Biomarkers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
 28. Masotti S, Prontera C, Musetti V, et al. Evaluation of analytical performance of a new high-sensitivity immunoassay for cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:492-501.
 29. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. *Clin Chem Lab Med* 2018. doi: 10.1515/cclm-2017-1101.
 30. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a new ADVIA immunoassay using the Centaur XPT platform system for the measurement of cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018. doi: 10.1515/cclm-2017-0387.
 31. Clerico A, Ripoli A, Masotti S, et al. Pilot study on harmonization of cardiac troponin I immunoassays using patients and quality control plasma samples. On behalf of the Italian Section of the European Ligand Assay Society (ELAS) and of the Study Group on Cardiovascular Biomarkers of the Società Italiana di Biochimica Clinica (SIBioC). *Clin Chim Acta* 2016;456:42-48.
 32. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantitation capabilities. *Pure Appl Chem* 1995;67:1699-723.
 33. ISO 11843-1:1997, Capability of detection – Part 1: Terms and definitions. <https://www.iso.org/standard/1096.html> (ultimo accesso: Marzo 2018).
 34. Clinical Laboratory Standards Institute. CLSI document EP17-A. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation. Approved guidelines. 2004. <http://demo.nextlab.ir/getattachment/98997564-97ae-4a9f-b03f-0f5deea6e523/CLSI-EP17-A.aspx> (ultimo accesso: Marzo 2018)
 35. Clinical Laboratory Standard Institute. CLSI EP21 protocol. Evaluation of total analytical error for quantitative medical laboratory measurement procedure. 2nd ed, July 2016. Wayne, Pennsylvania, 2016.
 36. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 2008;29(Suppl i):S49-S52.
 37. Ungerer JPJ, Pretorius CJ. High-sensitivity cardiac troponin: do think twice, it's not all right. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1669-71.
 38. Thompson M, Ellison SLR. Towards an uncertainty paradigm of detection capability. *Anal Methods* 2013;5:5857.
 39. Faber MN. The limit of detection is not the analyte level for deciding between "detected" and "not detected". *Accred Qual Assur* 2008;13:227-8.
 40. Pretorius CJ, Ungerer PJ. Improved diagnostic performance of high-sensitivity cardiac troponin assays is an artifact of censored data. *Clin Chem* 2016;55:1654-7.
 41. Boeckel JN, Palapies L, Zeller T, et al. Estimation of values below the limit of detection of a contemporary sensitive troponin I assay improves diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2015;61:1197-206.
 42. Parikh RH, Seliger SL, de Lemos J, et al. Prognostic significance of high-sensitivity cardiac troponin T concentrations between the limit of blank and limit of detection in community-dwelling adults: a meta-analysis. *Clin Chem* 2015;61:1524-31.
 43. Lackner K. High-sensitivity assays for cardiac troponins – continued. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1631-5.
 44. Jarolim P. Terminology of cardiac troponin assays and data censoring. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1672-4.
 45. Greene DN, Tate JR. Establishing consensus-based, assay-specific 99th percentile upper reference limits to facilitate proper utilization of cardiac troponin measurements. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1675-82.
 46. Price CP, Christenson RH. Adopting the principles of Evidence-Based Laboratory Medicine in routine practice. In: Price CP, Christenson RH, eds. *Evidence-Based Laboratory Medicine. From principles to outcomes*. Washington DC: AACC Press, 2003: 247-63.
 47. Altman DG, Royston P. The cost of dichotomizing continuous variables. *Br Med J* 2006;332:1080.
 48. Ellison SLR, Ramsey MH, Lawrence P, et al. Is measurement uncertainty from sampling related to analyte concentration? *Anal Methods* 2017;9:9589-96.
 49. Apple FS, Sandoval Y, Jaffe AS, et al.; 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.
 50. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays. *Clin Chem* 1996;42:140-5.
 51. FDA review memorandum. 510(k) Substantial Equivalence Determination Decision Summary Assay only Template; 510(k) Number: K162895. www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/k162895.pdf (ultimo accesso: Marzo 2018)
 52. Apple FS, Jaffe AS, Collinson P, et al. on behalf of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. IFCC educational materials on selected analytical and clinical applications of high sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Biochem* 2015;48:201-3.
 53. Eggers KM, Jaffe AS, Lind L, et al. Value of cardiac troponin I cut-off concentrations below the 99th percentile for clinical decision-making. *Clin Chem* 2009;55:85-92.
 54. Sinning C, Keller T, Zeller T, et al. Association of high-sensitivity assayed troponin I with cardiovascular phenotypes in the general population: the population-based Gutenberg health study. *Clin Res Cardiol* 2014;103:211-22.
 55. Giannitsis E, Katus HA. Off limits: highly sensitive troponin in the general population. *Eur Heart J* 2016;3737:2438-40.
 56. de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population. *JAMA* 2010;304:2503-12.
 57. Saunders JT, Nambi V, de Lemos JA, et al. Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary heart disease, heart failure, and mortality in the ARIC Study. *Circulation* 2011;123:1367-76.
 58. Wang TJ, Wollert KC, Larson MG, et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2012;126:1596-604.
 59. Hussein AA, Gottdiener JS, Bartz TM, et al.

- Cardiomyocyte Injury Assessed by a Highly Sensitive troponin assay and sudden cardiac death in the community: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:2112-20.
60. Blankenberg S, Salomaa V, Makarova N, et al. Troponin I and cardiovascular risk prediction in the general population: the BiomarCaRE consortium. *Eur Heart J* 2016;37:2428-37.
61. de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population. *JAMA* 2010;304:2503-12.
62. Everett BM, Zeller T, Glynn RJ, et al. High-sensitivity cardiac troponin I and B-type natriuretic peptide as predictors of vascular events in primary prevention: impact of statin therapy. *Circulation* 2015;131:1851-60.
63. Van Der Linden N, Klinkenberg LJJ, Bekers O, et al. Prognostic value of basal high-sensitive cardiac troponin levels on mortality in the general population. *Medicine* 2016;95:e5703.
64. Clerico A, Belloni L, Carrozza C, et al. A Black Swan in clinical laboratory practice: the analytical error due to interferences in immunoassay methods. *Clin Chem Lab Med* 2017; doi:/10.1515/cclm-2017-0881.
65. Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018; doi: 10.1177/2048872617748553.