

Esperienze pilota sulla Valutazione Esterna di Qualità della misura dell'emoglobina A₂ con campioni di sangue intero e metodiche HPLC commerciali

A. Mosca¹, R. Paleari¹, A. Giambona², M. Cannata², F. Leto², R. Li Muli², A. Maggio², per l'IFCC Working Group on Standardization of HbA₂ e per la Società per lo Studio delle Talassemie e delle Emoglobinopatie

¹Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi di Milano

²Unità Operativa Ematologia II con Talassemia, Azienda Ospedaliera "V. Cervello", Palermo

ABSTRACT

Pilot External Quality Assessment studies on hemoglobin A₂ (HbA₂) measurement in Italy with HPLC systems. To evaluate the extent of interlaboratory variation and accuracy in HbA₂ assay, two pilots studies of External Quality Assessment were organized in 2005 and 2006 among 48 and 65 Italian laboratories, respectively. As part of the study a survey was also performed by sending a questionnaire concerning some important analytical aspects related to the determination of HbA₂. The trial specimens consisted of whole blood samples with a normal, pathological and borderline HbA₂ content. All laboratories used HPLC analyzers from the same manufacturer (Bio-Rad Laboratories). Normal and pathological samples were clearly differentiated by all laboratories, while the data on the borderline sample partially overlapped the others. Overall interlaboratory CV were between 6.0% to 8.0% in the 2005 exercise, and between 8.9% and 9.6% in the 2006 exercise. To assign HbA₂ target values to the samples, the median of the laboratory group was used, after the exclusion of the outliers (2 data only over the 2 years). The accuracy of HbA₂ results was evaluated on the basis of allowable total error. The proportions of laboratories reporting unacceptable results at the thalassaemic level were 14.9% (2005 exercise) and 27.7 % (2006 exercise). No abnormalities in the chromatographic separation patterns were reported by any of the laboratories. We conclude that quality in the measurement of the HbA₂ should be improved.

INTRODUZIONE

Le sindromi talassemiche sono tra i più comuni disordini genetici tanto che si stima che in tutto il mondo circa l'1,7% della popolazione sia portatrice di geni talassemici (1). E' noto infatti che la talassemia ha una prevalenza significativa in diverse regioni del globo (bacino Mediterraneo, fino all'8%; Medio Oriente, fino al 10%; India, dal 3 al 15%; Sud-Est asiatico, fino al 9%) nelle quali rappresenta dunque un rilevante problema di salute pubblica. Tuttavia, taluni paesi quali il Nord Europa ed il Nord America nei quali la talassemia non è tipicamente endemica sono ora anche interessati dalle sindromi talassemiche, a causa degli intensi flussi migratori tipicamente Sud-Nord che hanno portato all'introduzione in queste aree di minoranze etniche ad alta incidenza di mutazioni talassemiche (2). Alcune recenti osservazioni epidemiologiche indicano che in Europa ci sarebbero ora circa 15000 soggetti con talassemia major (che richiede continue trasfusioni di sangue), e di questi ben 6000 risiederebbero in Italia (3,4). E' quindi di fondamentale importanza che siano sempre attuati opportuni programmi di prevenzione primaria, centrati sullo studio delle coppie a rischio, in modo da ridurre il tasso di nascita di bambini con morbo di Cooley.

In questo contesto, la misura dell'emoglobina A₂ (HbA₂) nel sangue ha un ruolo chiave nei programmi di screening della β -talassemia, dal momento che l'aumento in questa frazione emoglobinica è uno dei marker più tipici del portatore di geni β -talassemici. Si ricorda, tuttavia, che non sempre il tratto β -talassemico è accompagnato da un aumento marcato dell'HbA₂, perchè in circa l'1% dei casi (sul totale delle determinazioni annue) vengono identificati soggetti con valori borderline dovuti alla co-eredità di mutazioni dei geni α e/o δ globinici (5) con alleli β -talassemici, od alla presenza di mutazioni β -talassemiche lievi che ne modula negativamente l'espressione. E' anche noto che la presenza contemporanea di anemia sideropenica può mascherare il riconoscimento dell'eterozigote β -talassemico (6,7). Pertanto, a causa del margine estremamente ristretto che esiste tra valori fisiologici e valori patologici dell'HbA₂ nel sangue, è essenziale che la qualità della misura di questa frazione emoglobinica sia particolarmente buona, soprattutto quando bisogna identificare le coppie a rischio.

Nonostante il notevole valore diagnostico che la misura dell'HbA₂ riveste e le conseguenze anche molto pesanti che possano derivare, anche in termini penali, per una diagnosi sbagliata, mancano dati aggiornati sulla qualità delle misure dell'HbA₂ nel nostro paese. I pochi

dati reperibili risalgono ad alcuni studi pilota di Verifica Esterna della Qualità (VEQ) effettuati più di 15 anni or sono, quando le misure dell'HbA₂ venivano effettuate soprattutto con metodiche manuali (8-11).

Lo scopo quindi dei nostri studi è stato quello di raccogliere informazioni sulla variabilità interlaboratorio e sull'accuratezza delle misure dell'HbA₂ in Italia. A tal fine abbiamo organizzato in collaborazione con la Società per lo Studio delle Talassemie e delle Emoglobinopatie (So.S.T.E.), in regime ordinario due studi pilota di VEQ tra alcuni centri che in Italia misurano tale frazione emoglobinica. In una prima fase abbiamo anche effettuato un'indagine conoscitiva mirata a valutare la conoscenza, da parte dei laboratoristi, degli aspetti analitici e pre-analitici più importanti, unitamente al rilievo di una serie di altre informazioni (numero di test/settimana, tipo di metodica usata, intervalli di riferimento). Parte dei risultati ottenuti (relativamente ai dati del primo studio pilota) è già stata pubblicata (12). In questo lavoro analizziamo con maggior dettaglio i dati del primo esercizio e quelli raccolti, su un gruppo più numeroso, col secondo esercizio 2006.

MATERIALI E METODI

Gli esercizi hanno coinvolto 48 laboratori nel 2005 e 65 nel 2006. L'arruolamento è stato fatto su base volontaria, principalmente diffondendo l'iniziativa tra i centri aderenti alla So.S.T.E., ed anche su indicazioni dell'Azienda sponsorizzatrice.

Sono stati inviati campioni di sangue intero, raccolti da unità di sangue provenienti da donatori senza anomalie emoglobiniche o talassemiche (campioni A degli esercizi 2005 e 2006), e di due genitori di bambini con β -talassemia omozigote (donazione volontaria; campioni B dei due esercizi 2005 e 2006). Nell'esercizio 2005 è stato preparato un livello intermedio (campione C) miscelando opportunamente aliquote dei campioni A e B.

A tutti i soggetti è stato sottoposto preventivamente un consenso informato per la partecipazione allo studio ed i campioni sono stati raccolti solo dopo adesione scritta. Le sacche raccolte, prima di essere utilizzate, sono state sottoposte ai test sierologici di routine dei donatori di sangue secondo le vigenti norme in materia di trattamento di emoderivati.

Il sangue è stato raccolto in sacche da trasfusione con ACD e quindi dispensato in aliquote da 2 mL utilizzando gli appositi tubi pilota delle sacche da trasfusione, che sono stati quindi sigillati in sterilità. I campioni sono stati successivamente distribuiti ai centri mediante corriere in condizioni di temperatura controllata (4-8 °C). Ai partecipanti è stato chiesto di analizzare i campioni entro 5 giorni dal ricevimento, effettuando una singola misura per campione ed inserendo i campioni all'interno della loro normale serie analitica.

Tutti i partecipanti utilizzavano metodiche HPLC (Bio-Rad Laboratories), con le seguenti apparecchiature ed i kit di analisi corrispondenti: D/10 (dual kit), Variant I (variant I beta-thal kit), Variant II (variant II beta-thal kit o

dual-kit). La numerosità degli utenti delle singole metodiche è riportata nella Tabella 1. Sui risultati ottenuti le elaborazioni sono state effettuate separatamente per metodica e per campione. Per la valutazione dell'accuratezza lo scostamento delle singole misure è stato calcolato rispetto alla mediana di consenso, calcolata dopo l'eliminazione dei dati aberranti (eccedenti le 3 DS dalla media). Il numero totale dei risultati aberranti è stato di 4 (tre nell'esercizio 2005 ed uno in quello del 2006).

La qualità delle misure fornite è stata valutata rispetto ai traguardi analitici, che sono stati recentemente calcolati sulla base dei dati di variabilità biologica (13), e che sono riassunti nella Tabella 2.

RISULTATI

La Tabella 1 riporta i risultati dei due esercizi, raccolti da tutti i partecipanti. Non si evidenziavano, in entrambi gli studi, significative differenze nella variabilità interlaboratorio, rispettivamente ai gruppi di metodiche HPLC utilizzate. In entrambi gli esercizi si è riscontrata una variabilità leggermente superiore alle concentrazioni inferiori di HbA₂.

Le distribuzioni dei risultati ottenuti sono riportate nella Figura 1. Si può osservare che in entrambi gli esercizi tutti i laboratori hanno chiaramente differenziato i campioni da soggetti normali (i campioni A) da quelli dei portatori di β -talassemia (campioni B). Nell'esercizio 2005 tuttavia, relativamente al campione C, alcuni valori si sovrapponevano, nella coda sinistra della distribuzione, al limite superiore dei valori ottenuti sul campione normale e, per la coda destra della distribuzione dei valori di C, ai valori più bassi misurati sul campione B.

Utilizzando come target per l'errore totale il limite desiderabile del 7,6%, abbiamo calcolato i limiti di accettabilità per i campioni A-C dell'esercizio 2005 e per i campioni A e B dell'esercizio 2006 ed abbiamo verificato le distribuzioni dei risultati ottenuti rispetto a tali target, ottenendo i dati riassunti nella Tabella 3. Utilizzando questo approccio è risultato che la proporzione di laboratori che ha fornito risultati non accettabili oscillava dal 14,9% (7 su 47, relativamente al campione B dell'esercizio 2005) al 27,7% (18 su 65, relativamente al campione B dell'esercizio 2006). Sui campioni di portatori di β -talassemia, nel 2005 5 laboratori su 47 hanno fornito valori più bassi rispetto al limite accettabile dell'errore totale e 2 su 47 hanno fornito valori più alti. Nello studio 2006 si è riscontrata analogamente una maggiore percentuale di errori di sottostima, con 11 laboratori su 65 che hanno fornito un valore inferiore al limite accettabile dell'errore totale e 7 su 65 che hanno riportato un valore superiore al limite superiore dell'errore totale ammissibile.

Per quanto riguarda il questionario, distribuito solo a 19 laboratori durante la fase di preparazione dell'esercizio 2005, i risultati più significativi ottenuti possono essere così riassunti: (a) la maggior parte di laboratori esegue tra 20 e 100 determinazioni di HbA₂ per settimana; (b) la maggior parte delle richieste arriva dal consultorio genetico e dai reparti di Ginecologia e Pediatria; (c) sono state rilevate differenze negli intervalli di riferimento

Tabella 1

Dati ottenuti nei due studi pilota raggruppati per tipo di metodica

Esercizio 2005 metodiche	Campione	HbA ₂ , %					CV %	n
		Media	DS	Min	Max	Mediana		
D10	A	2.6	0.2	2.3	2.7	2.6	7.7	4
	B	5.1	0.3	4.6	5.3	5.2	5.9	4
	C	3.9	0.2	3.6	4.0	3.9	5.1	4
Variant	A	2.6	0.2	2.0	3.1	2.6	7.7	24
	B	5.0	0.2	4.5	5.4	5.0	4.0	23
	C	3.9	0.2	3.4	4.2	3.9	5.1	23
Variant II beta-tal	A	2.6	0.2	2.2	2.8	2.6	7.7	8
	B	4.9	0.4	4.2	5.3	5.0	8.2	8
	C	3.8	0.3	3.2	4.2	3.9	7.9	8
Variant II dual kit	A	2.4	0.1	2.2	2.7	2.3	4.2	11
	B	5.0	0.3	4.6	5.7	4.9	6.0	12
	C	3.8	0.3	3.1	4.4	3.7	7.9	12
Tutti i metodi	A	2.5	0.2	2.0	3.1	2.6	8.0	47
	B	5.0	0.3	4.2	5.7	5.0	6.0	47
	C	3.8	0.3	3.1	4.4	3.8	7.9	47

Esercizio 2006 metodiche	Campione	HbA ₂ , %					CV %	n
		Media	DS	Min	Max	Mediana		
D10	A	2,7	0,3	2,2	3,3	2,8	9,1	18
	B	4,9	0,5	4,0	6,3	4,9	10,5	19
Variant	A	2,5	0,2	1,8	2,8	2,5	8,9	19
	B	4,7	0,4	3,6	5,1	4,9	8,5	19
Variant II beta-tal	A	2,6	0,3	2,0	3,0	2,6	10,0	11
	B	5,1	0,4	4,2	5,8	5,2	8,1	11
Variant II dual kit	A	2,6	0,2	2,3	3,0	2,7	8,8	16
	B	5,1	0,4	4,5	5,6	5,2	6,8	16
Tutti i metodi	A	2,6	0,3	1,8	3,3	2,6	9,6	64
	B	4,9	0,4	3,6	6,3	5,0	8,9	65

adottati, col limite superiore che oscillava dal 3,0 al 3,5% e con limiti inferiori per l'identificazione del tratto β -talassemico che oscillavano da 3,1 a 3,7%; (d) per l'esclusione dell'anemia sideropenica è emerso che il 68% dei partecipanti usava inserire l'esame della ferritina sierica ed il 5% la misura della sideremia.

DISCUSSIONE

Nella presente comunicazione abbiamo riportato i risultati di due studi pilota sulla misura dell'HbA₂ nel sangue. I dati ottenuti dimostrano che, anche all'interno di

un gruppo rappresentativo di laboratori che utilizzavano tutti esclusivamente metodiche HPLC dello stesso produttore, esiste una variabilità analitica che deve essere migliorata. È facile immaginare che nel contesto nazionale la variabilità globale, includendo anche le metodiche HPLC di altri produttori di diagnostici, e le tecniche elettroforetiche e di scambio ionico su minicolonnine, debba essere ancora superiore. In effetti i risultati della VEQ interregionale coordinata dall'Azienda Ospedaliero-Universitaria "Careggi" di Firenze dimostrano (anche se con materiali liofilici) CV attorno al 20%.

Le possibili implicazioni dei nostri risultati nella classi-

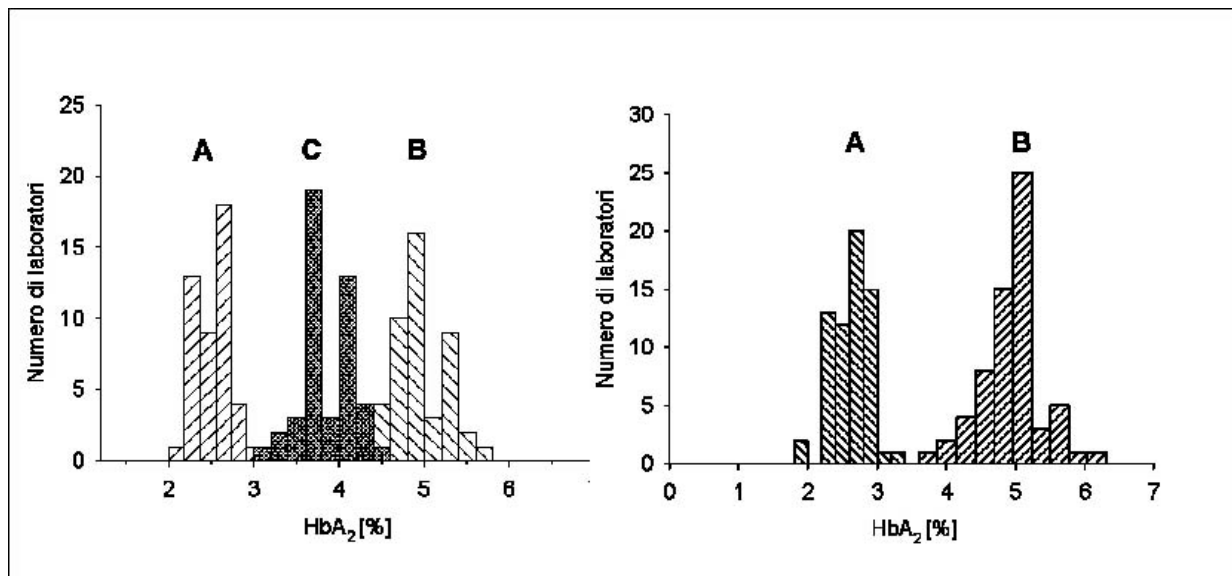


Figura 1

Distribuzioni di frequenza dei valori ottenuti dai laboratori nei due esercizi 2005 (sinistra) e 2006 (destra).

Tabella 2

Traguardi analitici per l'imprecisione, lo scostamento sistematico (bias) e l'errore totale nella misura dell'HbA₂, espressi a tre differenti livelli di qualità nell'esecuzione del test

Traguardi per	Livello di qualità		
	Minimo (%)	Desiderabile (%)	Ottimale (%)
Imprecisione	2,3	1,6	0,8
Scostamento sistematico (bias)	7,6	5,1	2,5
Errore Totale	11,4	7,6	3,8

Tabella 3

Riepilogo dei risultati forniti dai laboratori valutati sulla base dell'errore totale

	HbA ₂ , % valore target	Intervallo di accettabilità	Risultati non accettabili	
			<limite inferiore	>limite superiore
<i>Studio 2005</i>				
A	2,6	2,4-2,8%	14/47 (29,8%)	1/47 (2,1%)
B	5,0	4,6-5,4%	5/47 (10,6%)	2/47 (4,3%)
C	3,8	3,5-4,1%	3/47 (6,4%)	5/47 (10,6%)
<i>Studio 2006</i>				
A	2,6	2,4-2,8%	8/64 (12,5%)	9/64 (14,1%)
B	5,0	4,6-5,4%	11/65 (16,9%)	7/65 (10,8%)

ficazione clinica dei pazienti possono essere le seguenti. Assumendo che il campione A dello studio 2005 sia rappresentativo di un soggetto non portatore di tratto β -talassemico e che il campione B dello stesso esercizio sia quello tipico di un portatore di β -talassemia, i nostri risultati dimostrerebbero che nessun laboratorio sarebbe

in grado di confondere le due diagnosi. Tuttavia, ipotizzando ad esempio che il campione C dell'esercizio 2005 fosse stato raccolto da un soggetto con doppia eterozigosi per α e β -talassemia, o per δ e β talassemia, 9 su 47 partecipanti (cioè coloro che avevano riportato su tale

campione valori di HbA₂ > 4,0%) lo avrebbero classificato come portatore di β-talassemia e 2 su 47 (pari al 4,2% sul totale dei partecipanti, ed in particolare coloro che avevano riportato valori inferiori a 3,2% su questo campione) lo avrebbero classificato come normale. Quest'ultimo errore di classificazione è ovviamente più grave del precedente e dovrebbe servire da stimolo per migliorare la qualità delle misure dell'emoglobina A₂. Per questioni organizzative non è stato possibile, nell'esercizio 2006, fare analizzare anche un campione con livello intermedio di HbA₂ e quindi non siamo in grado di ripetere tale analisi.

Le informazioni raccolte col questionario hanno anche indicato, seppure su un numero più esiguo di partecipanti, che è necessario diffondere procedure armonizzate per lo screening delle talassemie a livello di laboratorio. Da questo punto di vista è da segnalare che la istituzione da parte della IFCC di un Working Group per la standardizzazione dell'HbA₂ potrà portare allo sviluppo di un sistema di riferimento per la misura di tale frazione emoglobinica e quindi facilitare l'allineamento delle metodiche analitiche. I primi risultati finora ottenuti sembrano essere incoraggianti (14).

Infine vorremmo sottolineare l'impiego del sangue intero come materiale per la VEQ al posto di materiale liofilizzato. L'uso del sangue elimina gli effetti matrice e riduce al minimo la possibilità di una non corretta manipolazione dei campioni di controllo, che è sovente causa di errori nelle valutazioni multicentriche (15,16). D'altro canto, la limitazione all'uso dei campioni di sangue nelle VEQ è legata alla possibile denaturazione dei campioni durante il trasporto e prima delle analisi. Nei nostri studi tuttavia non ci sembra di avere notato problemi di tale natura, anche perché nessun partecipante ha riportato anomalie nei cromatogrammi o particolari ritardi nell'arrivo dei materiali. Aver spedito i campioni di sangue utilizzando i tubi pilota delle sacche trasfusionali ha probabilmente contribuito al mantenimento dei campioni nelle migliori condizioni.

In conclusione, auspichiamo che i dati preliminari raccolti sulla variabilità interlaboratorio in questo studio possano servire da stimolo per migliorare la qualità delle misure di questa importante frazione emoglobinica al fine di contribuire, anche sul fronte del laboratorio, a ridurre al minimo la nascita di bambini con morbo di Cooley ed a migliorare lo screening e la diagnosi delle sindromi talassemiche.

Centri che hanno preso parte agli studi

S. Arrigo, Milazzo; P. Bonini, Milano; P. Bonomo, Ragusa; A. Borsellino, Salerno; M. Brini, Reggio Emilia; R. Caldarera, Messina; M. Caldora, Napoli; S. Cancellaro, Salerno; F. Canizzo, Vittoria; R. Carrino, Aversa; P. Castaldo, Napoli; P. Cianciulli, Roma; M. Conte, Scafati; C. Cortese, Paternò; A. Crifò, Messina; L. D'Agostino, Casandrino; M. D'Alessandro, Palermo; D. Dascola, Reggio Calabria; C. Di Girgenti, Palermo; M. D'Orazio, Pollena Trocchia; P. Esposito, Napoli; F.

Fazzi, Enna Bassa; F. Ferrara, Agrigento; M. Ferreri, Caltanissetta; M.G. Ferro, Catania; A. Finocchiaro, Paternò; M. Francese, Napoli; R. Galanello, Cagliari; D. Giambelluca, Palermo; G. Girlando, Catania; S. Granata, Milano; T. Gristina, Palermo; G. Ivaldi, Genova; S. Leanza Mantegna, San Gavino; N. Locorotondo, Palermo; G. Lombardi, Grumo Nevano; A. Maggio, Palermo; C. Magnano, Catania; A. Maniscalco, Roma; S. Mascali, Caltagirone; P. Materia, Patti; G. Meli, Licata; M. Meo, Messina; M. Mercadanti, Parma; M. Morrone, Catania; C. Mostaccio, Milazzo; R. Motta, Bologna; A. Nappi, Scafati; R. Pace, Piazza Armerina; L. Pagano, Napoli; G. Papa, S.Felice a Cancellò; A. Pietrapertosa, Bari; G. Pistolese, Salerno; G. Qualtieri, Cosenza; G. Randazzo, Palmi; G. Rescigno, Nocera Inferiore; B. Ricerca, Roma; E. Roccabruna, Reggio Calabria; G. Roccamo, S. Agata di Militello; M.A. Romeo, Catania; A. Rosolia, Pagani; G. Ruggeri, Bagheria; A. Salvadori, Firenze; A. Sanantonio, Napoli; A. Simone, Manocalzati; A. Sorrentino, Pomigliano D'Arco; R. Spampinato, Lentini; T. Stampone, Palermo; G. Strazzeri, Canicattì; F. Terracciano, Somigliano D'Arco; P. Testasecca, Palermo; M.O. Vaccari, Rovigo; F. Vitale, Partinico; A. Zanella, Milano; L. Zefferino, Secondigliano.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Dott. Gianni Bertoli (Bio-Rad Laboratories) per aver supportato questi studi per quanto riguarda le spese di raccolta e spedizione dei materiali ed il personale del Centro Trasfusionale e dell'Associazione "Piera Cutino" dell'Azienda Ospedaliera "V. Cervello" di Palermo per la raccolta del sangue da donatori. Si ringrazia infine il Dott. Pietro Bonomo (Ospedale Civico, Ragusa) per i preziosi consigli. Studio in parte supportato da un finanziamento della CE (ENERCA II, titolare AM).

BIBLIOGRAFIA

1. Rund D, Rachmilewitz E. β-Thalassemia. *N Engl J Med* 2005;353:1135-46.
2. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization* 2001;79:704-12.
3. Galanello R, Eleftheriou A, Traeger-Synodinos J, et al. Prevention of Thalassemias and other haemoglobin disorders. Published by Thalassemia International Federation, 2003.
4. Angastiniotis M, Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1998;850:251-69.
5. Giambona A, Passarello C, Ruggeri G, et al. Analysis of δ-globin gene alleles in the Sicilian population: identification of five new mutations. *Haematologica* 2006; 91:1684-7.
6. Giambona A, Lo Gioco P, Marino M, et al. The great heterogeneity of thalassemia molecular defects in Sicily. *Hum Genet* 1995;9:526-30.
7. Galanello R, Barella S, Ideo A, et al. Genotype of subjects with borderline hemoglobin A₂ levels: implication for β-thalassemia carrier screening. *Am J Hematol* 1994;46:79-81.
8. White JM, Lewis SM. A report on the interlaboratory quantitation of haemoglobin A₂ and haemoglobin F. *J Clin*

- Pathol 1973;26:864-7.
9. Schmidt RM, Brosious EM. Quantitation of hemoglobin A₂. An interlaboratory study. *Am J Clin Pathol* 1979;71:534-9.
 10. Franzini C. Liquid control materials for haemoglobin A₂ and F: a one-year interlaboratory evaluation. *Ann Clin Biochem* 1985;22:257-60.
 11. Salvati AM, Maffi D, Caprari P, et al. A pilot programme of external quality assessment for general haematology in Italy. *Annali Istituto Superiore di Sanità* 1995;31:131-9.
 12. Paleari R, Giambona A, Cannata M, et al. External quality assessment of haemoglobin A₂ measurement: data from an Italian pilot study with fresh whole blood samples and commercial HPLC systems. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:88-92.
 13. Paleari R, Cannata M, Leto F, et al. Analytical evaluation of Tosoh HLC-723 G7 automated HPLC analyzer for hemoglobin A₂ and F determination. *Clin Biochem* 2005;38:159-65.
 14. Mosca A, Paleari R, Bissè E, et al. A. Development of a reference system for HbA₂ [abstract]. European Association for Red Cell Research, EARC 15th meeting, 2005:67.
 15. Weykamp CW, Penders TJ, Miedema K, et al. Standardization of glycohemoglobin results and reference values in whole blood studied in 103 laboratories using 20 methods. *Clin Chem* 1995;41:82-6.
 16. Mosca A, Paleari R, Scimè-Degani V, et al. Inter-method differences and commutability of control materials for HbA₂ measurement. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:997-1002.