

Kardiální troponin T ultrasenzitivní metodou – porovnání metod

Vašatová M., Holečková M., Bartošková I., Tichý M., Friedecký B.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice, Hradec Králové

SOUHRN

Cíl sdělení: Cílem naší studie bylo porovnat koncentrace troponinu T měřeného klasickými a ultrasenzitivními metodami.

Metody: Pro stanovení sérových hladin cTnT (4. generace) a hs-cTnT byly použity systémy Elecsys 2010 a E170 Modular (metody: Elecsys Troponin T hs, Elecsys Troponin T, Elecsys Troponin T hs STAT a Elecsys Troponin T STAT) (Roche). Kardiální troponin T byl měřen simultánně v 72 vzorcích séra.

Statistické vyhodnocení výsledků měření bylo provedeno pomocí Bland-Altmanovy analýzy a Passing-Bablokovy regrese. Byly srovnány počty výsledků ve vztahu k hodnotám mezi detekce a rozhodovacích limitů.

Výsledky: V nízkých koncentracích (< 50 ng/l) byly nalezeny o 20–100% vyšší hodnoty hs-cTnT ve srovnání s cTnT 4. generace. Výsledky hs-cTnT měřené na systému Elecsys 2010 a modulu E170 byly srovnatelné. Vyšší počet výsledků nad rozhodovací limit u metody hs-cTnT znamená významnou změnu v diagnostické klasifikaci ve srovnání s metodou cTnT 4. generace.

Závěry: Nízké koncentrace troponinu T (< 30 ng/l) mohou být užitečné pro klinickou klasifikaci, ale metody pro hs-cTnT a cTnT jsou v nízkých koncentracích navzájem nesrovnatelné. Naše data ukazují existenci diferencí v kalibracích metod. Bylo by zapotřebí podstatně přesněji definovat návaznost metod k referenčním materiálům, respektive věnovat úsilí k jejich vytváření. Vzhledem k jasnému trendu zvyšování analytické senzitivity měření cTnT by bylo vhodné, aby byla komerčně dostupná jen citlivější souprava hs-cTnT.

Klíčová slova: troponin T, ultrasenzitivní, akutní koronární syndrom, kardiální marker.

SUMMARY

Vašatová M., Holečková M., Bartošková I., Tichý M., Friedecký B.: High-sensitivity cardiac troponin T – method comparison

Background: The aim of our study was to compare concentration of troponin T measured by classic and high-sensitivity methods.

Methods: Elecsys 2010 and E170 Modular system was used to assess the serum levels of cTnT and hs-cTnT (methods: Elecsys Troponin T hs, Elecsys Troponin T, Elecsys Troponin T hs STAT and Elecsys Troponin T STAT) (Roche). Cardiac troponin T was measured in 72 serum samples simultaneously. Bland-Altman analysis and Passing-Bablok regression were used for statistic interpretation. Numbers of results in relation to limit of detection and decision limits were compared.

Results: In low concentration level (< 50 ng/l), hs-cTnT were higher in comparison with cTnT about 20–100%. Results of hs-cTnT measured by Elecsys 2010 and E170 Modular systems were comparable. Higher number of results above decision limit in hs-cTnT method means significant change of the diagnostic classification in comparison with fourth generation of cTnT method.

Conclusions: Results of low troponin T concentration (< 30 ng/l) can be useful for clinical classification, but methods hs-cTnT and cTnT were not comparable in low concentration levels. Our data indicate existence of differences in calibrations of methods. It is necessary to define data relationship to reference materials more precisely, respectively to make an effort to their creation. With respect to clear trend increase of analytic sensitivity of cTnT measurement, only more sensitive hs-cTnT method should be commercially available.

Key words: troponin T, high-sensitivity, acute coronary syndrome, cardiac marker.

Úvod

V diagnostice akutních koronárních syndromů má stanovení biochemických markerů nekrózy myokardu, především troponinů, zásadní význam. U akutních koronárních syndromů bez elevace ST segmentů je jejich pozitivita známkou netransmurálního (non Q) infarktu myokardu a umožňuje detekovat i nemocné s nestabilní anginou pectoris. Nově v roce 2007 jako konsensus odborných společností ESC, ACCF, AHA a WHF byla publikována univerzální definice infarktu myokardu (AIM), ve které je přesně dáno použití biochemických markerů poškození myokardu. V první řadě jsou pro průkaz nekrózy myokardu doporučeny kardiálně specifické srdeční troponiny [1, 2].

Odborné společnosti doporučují jako cut-off pro diagnózu AIM koncentraci troponinu odpovídající 99. percentilu hodnot zdravé referenční populace, přičemž tato koncentrace musí být naměřená s celkovou analytickou nepřesností $CV \leq 10\%$ [1]. V současné době je proto celosvětovým trendem zvyšování citlivosti metod pro stanovení troponinů (I a T) a do popředí se dostávají tzv. ultrasenzitivní metody [3–9], které by měly splňovat požadavky kladené definicí AIM (1).

Validace ultrasenzitivní metody na stanovení troponinu T byla publikována v letošním roce [3]. Citlivost a reprodukovatelnost byla podle požadavků doporučení dostatečná, ale výsledky srovnání původní a nové generace metody nebyly v nízkých koncentracích troponinu T příliš uspokojivé. Na hladině cut-off původní

metody (30 ng/l) dávala ultrasenzitivní metoda přibližně o 75 % vyšší výsledky. Cílem naší práce bylo získat vlastní zkušenosti se stanovením troponinu T ultrasenzitivní metodou na analyzátoch používaných v naší laboratoři a porovnat obě metody a jednotlivé analyzátory mezi sebou.

Materiál a metoda

Firma Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) vyvinula ultrasenzitivní metodu pro stanovení kardiálního troponinu T (hs-cTnT) určenou pro imunochemické systémy. Celkově jsme hodnotili 72 vzorků séra pacientů (37 žen, 35 mužů, věk 68 ± 15 roků). Na imunochemickém modulu E-170 Modular (E170) jsme měřili cTnT běžně používanými metodami a pro analyzátor Elecsys 2010 (Elecsys) jsme použili statimové varianty analýzy (kity pro modul E170: Elecsys Troponin T hs, Elecsys Troponin T a kity pro Elecsys 2010: Elecsys Troponin T hs STAT, Elecsys Troponin T STAT). Pro porovnání metod jsme měřili simultánně troponin T ve vzorcích novou ultrasenzitivní i původní metodou (4. generace).

První soubor porovnáva data naměřená původní a ultrasenzitivní metodou na modulu E-170 Modular. Druhý soubor obsahuje výsledky obou generací metod z analyzátoru Elecsys 2010. Třetí skupinu dat tvoří hodnoty naměřené ultrasenzitivní metodou na obou analyzátoch. Ke statistickému hodnocení výsledků byla použita Bland-Altmanova analýza a regrese podle Passing-Babloka. Výsledky byly zpracovány v programu MedCalc (Belgie).

Obdobně jako u ostatních diagnostických souprav byla kalibrace poskytnuta kalibrační laboratoří výrobce. Šestibodová kalibrační funkce je součástí čárového kódu každé soupravy a uživatel provádí jen adjustaci této křivky na laboratorní podmínky pomocí dvou kalibrátorů. Kromě vzorků jsme také proměřili koncentrace cTnT v kalibrátorech použitých pro kalibraci systému E170 jako vzorky. Kalibrátory byly měřeny metodami Elecsys Troponin T hs, Elecsys Troponin T a Elecsys Troponin T hs STAT.

Pro vnitřní kontrolu kvality byly použity kontrolní materiály dodávané výrobcem jako součást měřicích systémů. Bohužel koncentrace obou kontrol pro ultrasenzitivní metodu jsou vyšší než udávané cut-off metody 14 ng/l (27,5 ng/l a 2360 ng/l).

Výsledky

Tabulka 1 ukazuje pro jednotlivé metody procentuální zastoupení vzorků s koncentrací troponinu T pod limitem detekce, pod cut-off hodnotou a v rozmezí limitu detekce a cut-off. U metody 4. generace je za cut-off hodnotu (30 ng/l) považována nejnižší koncentrace, u které je možné získat výsledek s $CV < 10\%$. Ultrasenzitivní metoda má hodnotu cut-off (14 ng/l) nastavenou jako 99. percentil koncentrací troponinu T u zdravých jedinců, přičemž je tato koncentrace měřená s nepřesností menší než 10 %.

Z těchto dat vyplývá že ultrasenzitivní metody dokáží detekovat koncentrace troponinu T u 80–90 % vzorků. Dalších přibližně 10 % vzorků je v rozmezí koncentrací mezi limitem detekce a hodnotou cut-off, což jsou koncentrace, při kterých je nepřesnost měření větší než 10%. Kvantifikace výsledků s $CV < 10\%$ je tak možná přibližně u 70 % vzorků. Metodou 4. generace je možné kvantifikovat troponin T přibližně u 50 % vzorků.

Modul E-170 Modular

Pro srovnání metod Elecsys Troponin T hs a Elecsys Troponin T na modulu E170 bylo hodnoceno 35 vzorků, u kterých byla na obou systémech naměřena číselná hodnota koncentrace. Rozsah naměřených koncentrací byl 10–3400 ng/l. Regrese podle Passing-Babloka měla následující rovnici:

$$Y (\text{Troponin T hs}) = 0,9194 \cdot X (\text{Troponin T}) + 0,0182$$

V nízkých koncentracích okolo hladiny cut-off pro metodu 4. generace (pod 50 ng/l), byly hodnoty naměřené ultrasenzitivní metodou systematicky vyšší o 20–100 % ($n = 11$). Tyto diference ukazuje Bland-Altmanův diagram na obrázku 1. Rovnice regrese na této koncentrační úrovni byla:

$$Y (\text{Troponin T hs}) = 1,0909 \cdot X (\text{Troponin T}) + 0,0134$$

Systém Elecsys 2010

Na systému Elecsys byly hodnoceny metody Elecsys Troponin T hs STAT a Elecsys Troponin T STAT. Pro výpočet bylo použito 35 vzorků s koncentracemi cTnT v rozmezí 10–3420 ng/l. Rovnice Passing-Bablokovi regrese byla:

$$Y (\text{Troponin T hs STAT}) = 0,8883 \cdot X (\text{Troponin T STAT}) + 0,0214$$

Table 1. Percentage of samples with concentration of Troponin T lower than limit of detection (LOD), lower than cut-off value and in range between LOD and cut-off

Method	Troponin T	Troponin T STAT	Troponin T hs	Troponin T hs STAT
Analyzer	modul E 170	Elecsys 2010	modul E 170	Elecsys 2010
LOD (ng/l)	10	10	5	5
cut-off value (ng/l)	30	30	14	14
< LOD (%)	48.6	52.8	12.5	19.4
Between cut-off and LOD (%)	11.1	8.3	16.6	6.9
< cut-off (%)	59.7	61.1	29.1	26.3

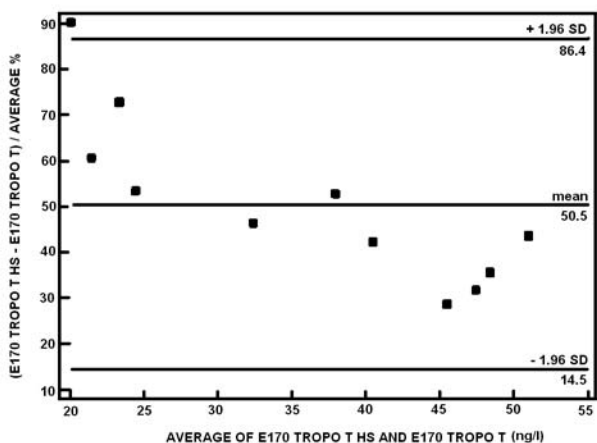


Fig. 1. Bland-Altman analysis – comparison of Elecsys Troponin T hs (E170 Modular) and Elecsys Troponin T (E170 Modular) methods

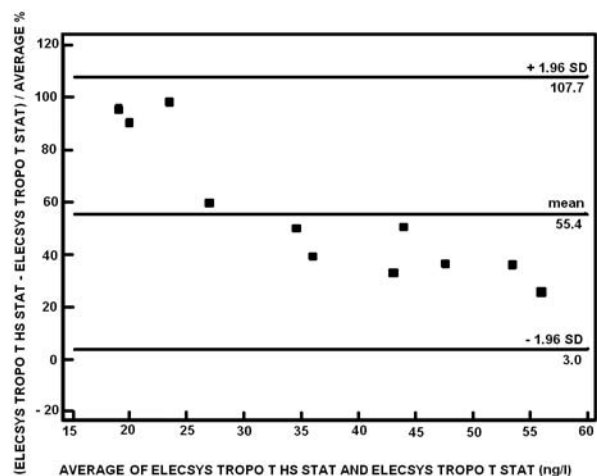


Fig. 2. Bland-Altman analysis – comparison of Elecsys Troponin T hs STAT (Elecsys 2010) and Elecsys Troponin T STAT (Elecsys 2010) methods

Obdobně jako u modulu E170 byla i v případě Elecsysu zaznamenána systematická odchylka o 20–100 % hodnot v nízkých koncentracích cTnT (n = 11). Bland-Altmanův graf je na obrázku 2. Rovnice regrese na koncentrační úrovni pod 50 ng/l (4. generace) byla:
 $Y (\text{Tropo T hs STAT}) = 0,9375 \cdot X (\text{Tropo T STAT}) + 0,0186$

Ultrasenzitivní metody

Pro porovnání analýzy cTnT ultrasenzitivní metodou (Elecsys Troponin T hs STAT a Elecsys Troponin T hs) na obou analyzátořech bylo hodnoceno 56 vzorků s rozsahem naměřených koncentrací 3 - 3140 ng/l. Passing-Bablokova regrese měla rovnici:
 $Y (\text{E170}) = 0,9477 \cdot X (\text{Elecsys}) + 0,0016$

Na úrovni nízkých koncentrací troponinu (pod 100 ng/l na E170, n = 38) měla rovnice regrese tvar:
 $Y (\text{E170}) = 0,8564 \cdot X (\text{Elecsys}) + 0,0033$

V případě porovnání obou analyzátořů nebyla nalezena systematická odchylka hodnot, ale difference v naměřených datech byly zatíženy vlivem vyšší nejistoty měření a pohybovali se v rozmezí ± 50 %. Bland-Altmanův graf ukazuje obrázek 3.

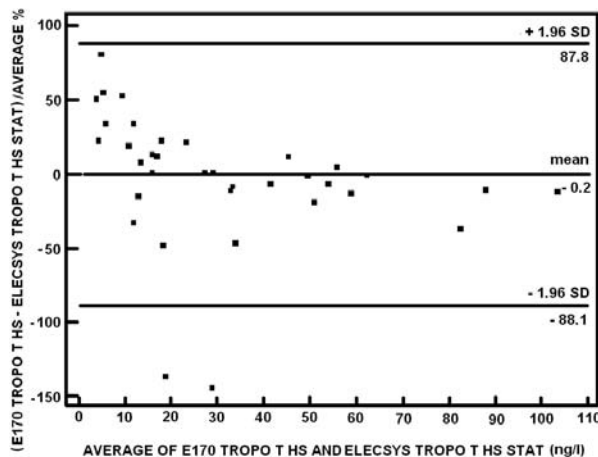


Fig. 3. Bland-Altman analysis – comparison of Elecsys Troponin T hs STAT (Elecsys 2010) and Elecsys Troponin T hs (E170 Modular) methods

Table 2. Troponin T concentrations in calibrators measured by different methods

Method	Tropo T hs	Tropo T	Tropo T hs STAT
Analyzer	modul E170	modul E170	Elecsys 2010
Elecsys Troponin T hs Cal 1 (ng/l)	23	< 10	8
Elecsys Troponin T hs Cal 2 (ng/l)	5340	5600	3990
Elecsys Troponin T Cal 1 (ng/l)	89	78	78
Elecsys Troponin T Cal 2 (ng/l)	9485	10035	7655

Kalibrátory

Výsledky koncentrací naměřených v jednotlivých kalibrátorech jsou uvedeny v tabulce 2. V některých případech byly rozdíly mezi naměřenými koncentracemi u kalibrátorů poměrně značné.

Diskuse

Přechod na ultrasenzitivní metody pro stanovení troponinů je celosvětový trend. Použití ultrasenzitivních metod na stanovení troponinů je nesporně přínosem a všechny laboratoře by měly postupně přejít na tyto nové metody. Jako cut-off pro diagnózu infarktu myokardu byla stanovena hodnota 99. percentilu zdravé populace s chybou CV < 10 %. Zvýšené hodnoty hs-cTn nad cut-off mají vždy svůj původ v poruše struktury kardiomyocytů. Proto je v současné době třeba soustředit se na sledování nových informací, které může přinést zvýšení citlivosti metod na stanovení troponinů, zaměřit se především na klinickou interpretaci mírně zvýšených výsledků a na definování rozhodovacích limitů pro jednotlivá kardiovaskulární poškození. Ovšem kromě klinické problematiky je třeba věnovat velkou pozornost i analytickým problémům nových ultrasenzitivních metod a jejich standardizaci. Problémy se

standardizací při analýze troponinu I jsou všeobecně známé již delší dobu. Ovšem s příchodem ultrasenzitivních metod se množství metod na stanovení obou typů troponinů ještě rozšiřuje a problém se standardizací se začíná objevovat i u troponinu T. Proto jsme se zabývali porovnáním metod na stanovení troponinu T na jednotlivých analyzátořech.

První dva soubory dat naměřené na obou analyzátořech původní a ultrasenzitivní metodou ukazují podobné výsledky s validací metody publikovanou Giannitsisem [3]. U obou analyzátořů byla v nižších koncentracích nalezena systematická diference výsledků. Na hladině cut-off původní metody 4. generace jsme ultrasenzitivní metodou naměřili troponin v průměru o 50 % (20–100%) vyšší. Giannitsis [3] uvádí odchylku přibližně 75 %. Ve vyšších koncentracích jsou naopak koncentrace naměřené ultrasenzitivní metodou přibližně o 20 % nižší. Také zvýšené počty výsledků nad rozhodovací limit u soupravy hs-cTnT jsou podobné, jako u zmíněné práce Giannitsise [3], a ilustrují nutnost řešení problémů laboratoří s reinterpretačí zvýšených hodnot cTnT.

Při porovnání ultrasenzitivní metody měřené na obou analyzátořech (E170 a Elecsys) jsme nezaznamenali výrazné odchylky v celém měřeném rozsahu koncentrací. Výsledky z obou analyzátořů se dobře shodují. Jen v nízkých koncentracích troponinu T (pod 100 ng/l) se projevila vyšší nepřesnost měření (náhodné chyby). Systematická odchylka měření nebyla v tomto případě nalezena.

Neshody ve výsledcích mohou být pravděpodobně způsobeny problémy v kalibracích a návazností kalibrátorů na referenční materiál. Výrobce sice posloupanost návaznosti v příbalových informacích deklaruje, ale naše výsledky ukazují signifikantní rozdíly v naměřených koncentracích kalibrátorů jednotlivými variantami metody. Z tohoto faktu vyplývá několik otázek. Proč není použit jeden kalibrátor pro všechny varianty metody na stanovení troponinu T, u kterého by byla jasně popsána návaznost na referenční standard? Jak je vůbec referenční standard zvolen? Proč používá firma ke kalibraci několik různých kalibrátorů? A v případě, že je návaznost kalibrací v pořádku, proč se výsledky v nízkých koncentračních hladinách systematicky liší u jednotlivých generací metod?

Závěr

Zvýšení koncentrace troponinu vzniká v důsledku nekrózy nebo možná i ischemie kardiomyocytů. Vzhledem k vyšší analytické citlivosti jsou ultrasenzitivní metody schopné zachytit i změny malého rozsahu. Do

budoucná pravděpodobně všechny laboratoře přejdou na ultrasenzitivní metody. K dosažení plné diagnostické efektivity stanovení troponinu však bude nutná standardizace jeho stanovení. Podmínkou standardizace je jasná definice analytu (zatím je dána pouze v metodách použitými protilátkami) a vytvoření mezinárodního referenčního materiálu (ten zatím pro cTnT vůbec neexistuje). Souběžné úsilí o zvýšení analytické senzitivity a o postupnou standardizaci metody jsou hlavními úkoly nejbližší budoucnosti.

Literatura

1. **Thygesen, K., Albert, J. S., White, H. D.** Universal Definition of Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2007, roč. 50 (27), č. 22, p. 2173–2195.
2. **Friedecký, B., Engliš, M., Franeková, J. et al.** Doporučení České společnosti klinické biochemie ke stanovení biochemických markerů poškození myokardu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2008, roč. 16 (37), č. 1, s. 50–55.
3. **Giannitsis, E., Kurz, K., Hallermayer, K., Jarausch, J., Jaffe, A. S., Katus H. A.** Analytical Validation of a High-Sensitivity Cardiac Troponin T Assay. *Clin. Chem.*, 2010, roč. 56 (2), p. 254–261.
4. **Vasile, V. C., Saenger, A. K., Kroning, J. M., Jaffe, A. S.** Biological and Analytical Variability of a Novel High-Sensitivity Cardiac Troponin T Assay. *Clin. Chem.*, 2010, roč. 56 (7), p. 1086–1090.
5. **Aakre, K. M., Sandberg, S.** Can Changes in Troponin Results Be Useful in Diagnosing Myocardial Infarction? *Clin. Chem.*, 2010, roč. 56 (7), p. 1047–1049.
6. **Apple, F. S.** A New Season for Cardiac Troponin Assays: It's Time to Keep a Scorecard. *Clin. Chem.*, 2009, roč. 55 (7), p. 1303–1306.
7. **Morrow, D. A., Antman, E. M.** Evaluation of High-Sensitivity Assays for Cardiac Troponin. *Clin. Chem.*, 2009, roč. 55 (1), p. 5–8.
8. **Apple, F. S.** High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays: What Analytical and Clinical Issues Need to Be Addressed before Introduction into Clinical Practice? *Clin. Chem.*, 2010, roč. 56 (6), p. 886–891.
9. **Vašatová, M., Tichý, M., Pudil, R., Horáková, L., Tomko, T., Řeháček V.** První zkušenosti se stanovením kardiálního troponinu T high-senzitivní metodou. *Klin. Biochem. Metab.*, 2010, roč. 18 (39), č. 1, s. 23–25.

Práce byla podpořena výzkumnými záměry MZO 00179906 a MSM 0021620817.

Do redakce došlo 29. 9. 2010.

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Martina Vašatová
ÚKBD LF UK a FN
Fakultní nemocnice
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: ulrycmar@fnhk.cz