

Stanovení biochemických markerů akutního koronárního syndromu v roce 2008

Friedecký B.¹, Kratochvíla J.²

¹ Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové

² SEKK s.r.o., Pardubice

Souhrn

Přehledné sdělení o stavu analýz biochemických markerů akutního koronárního syndromu ke konci roku 2008. Pojednává o úrovni standardizace, hodnotách rozhodovacích limitů (cut off) a o stavu přesnosti výsledků měření. Hlavním vývojovým trendem je používání neustále citlivějších metod. To vede k významnému snižování hodnot mezi detekce a následně i hodnot cut-off. Přetrvávajícím nedostatkem je vzájemná nesrovnatelnost výsledků a jejich enormní závislost na použité metodě. Hlavní příčinou je nedostatečná definice analytů a rozdílnost reagenčních protilátek, použitých u různých metod. Z toho plyne i zatím nízká neefektivnost použití primárního referenčního materiálu NIST-SRM 2921. Důsledkem je různá klinická výpovědní hodnota při diagnóze a hodnocení prognózy stavu nemocných při použití různých metod stanovení.

Klíčová slova: cTnT, cTnI, cut-off, standardizace

Summary

Friedecký B, Kratochvíla J.: Determination of biochemical markers for acute coronary syndrom in 2008.

Minireview on recent state in measuring the biochemical markers for diagnosis and prognosis of acute coronary syndrome in 2008 year. Communication is based on the literature from 2008-2009. There are described level of standardization, cut off values and precision of measurement particularly at cut off values. Development of more sensitive methods with lower limit of detection and lower cut off values is typical at present. Despite of continued development remains strong non comparability of results reached by different methods. Poor definition of analytes and use of different reagent antibodies could be main reasons of this situation. Different decision-making in different methods consequently follows.

Key words: cTnT, cTnI, cut off, standardization

Úvod

Publikované sdělení shrnuje stav analytiky biochemických markerů akutního koronárního syndromu v současnosti ke konci roku 2008. Účelem publikace je poskytnutí aktuálních informací klinickým laboratorům a případně inspirace k perspektivní inovaci příslušného doporučení české společnosti klinické biochemie.

Diagnostické rozhodovací limity a relevantní analyty

Všechna soudobá doporučení o diagnóze akutního koronárního syndromu se již jednoznačně opírají pouze o troponiny jako biochemické markery. Stejně jednoznačné je definování hodnoty diagnostického rozhodovacího limitu (cut off) jako 99 percentilu referenční populace bez přítomnosti akutního koronárního syndromu. Předchozí řešení, které dovoľovalo volit jako cut-off nejnižší hodnotu, při níž je dosaženo přesnosti CV < 10 % je sporné, protože vede k možnosti ustanovit pro různé laboratoře řadu různých hodnot cut-off podle jejich analytických možností a schopností. Situaci je nutné řešit zásadněji zvýšením analytické citlivosti metod. Poskytování dalších, jinak, než jako 99 percentil definovaných hodnot cut-off výrobci není vhodné i když je doposud obvyklé. Vede k redundanci dat, ke komunikačním problémům mezi laboratořemi a kliniky a k interpretačním obtížím (Jaffé a spol 2008).

Určitou úroveň regionální verifikace hodnot cut off, poskytovaných výrobci je vhodné doporučit k potvrzení jejich platnosti v tomto regionu a jeho klinických laboratořích. Avšak požadavek výrobců, **stanovit si vlastní hodnoty cut-off na své vlastní referenční populaci** není realistický. K doposud často diskutovanému problému, zda není v určitých klinických situacích vhodnější stanovení CK MB (mass), je vhodné citovat práci, reprezentující současný názor kardiologů, že troponiny poskytují dokonce lepší diagnostiku reinfarktu, než CK-MB mass (Thygesen a spol 2007).

Standardizace

Výkonnostní parametry analytických metod stanovení troponinů se neustále mění. Zejména roste jejich analytická citlivost a úměrně k tomu klesají hodnoty meze detekce a také hodnoty cut off.

Aktualizaci analytických charakteristik současných 14 metod, dostupných pro automatické analyzátoři provedla Tateová (Tate 2008). 13 metod se týkalo stanovení cTnI a jedna (Roche) cTnT (3). Hodnoty cut-off, udávané výrobci jako nejnižší koncentrace cTn, které lze stanovit s přesností $CV \leq 10\%$ se pohybují v intervalu 0,03 až 0,16 $\mu\text{g/l}$. Pokud vezmeme v úvahu i metodu "ultrasenzitivního" cTnT Roche, právě v této době uváděnou na trh, snížila se dolní hranice výše uvedeného intervalu na 0,013 $\mu\text{g/l}$.

Údaje výrobců nepředstavují obvykle 99 percentil, ale již zmíněnou alternativní variantu nejnižší koncentrace, stanovitelné s CV pod 10%. Průměrná přesnost hodnot, udávaných výrobci jako cut-off se však v rutinní laboratoři namísto požadovaných a udávaných 10% pohybuje kolem 20%. Kritický význam hodnot cut-off implikuje nutnost používat kontrolní vzorky o koncentraci blízké hodnotám cut-off. Lze říci, že analytická citlivost a následně i přesnost měření troponinů stále zaostávají za požadavky na ně kladené.

Velmi výrazný je trend k produkci analyticky citlivějších metod. Ten by mohl být zúročen k snížení hodnot meze detekce a cut off ještě o 2 až 3 řády a také k spolehlivějšímu dosažení požadované hodnoty přesnosti pod 10%..

Experimenty se stanovením cTnI vysoce citlivou metodou kapilární chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie s využitím kapilárního toku (Wu a spol. 2006) ukázaly, že mez detekce je mnohem nižší, než jsou schopny produkovat dosavadní imunochemické metody posledních generací. V uvedené práci bylo dosaženo hodnoty meze detekce cTn 1,7 ng/l (4).

Hlavním problémem stanovení troponinů (5) je skutečnost, že v analyzovaných vzorcích se vyskytuje heterogenní směs rozdílných molekul (Panteghini a spol. 2008). Není tedy definován řádně předmět měření (6) tak, jak to vyžadují metrologická pravidla (ISO/IEC Guide 99:2008). V zásadě pak nejde o měření troponinu, ale oblasti jeho molekuly vymezené použitými záchytnými reagenčními protilátkami (obvykle jednou nebo dvěma).

Použité reagenční protilátky by měly být orientovány na stabilní části cTn, nacházející se ve středu makromolekuly, protože nejméně stabilní (proteolýzou štěpené) jsou C a N konce troponinů. Ze 14 metod hodnocených v práci Tateové (3) se nenašel ani jediný pár metod s totožnými protilátkami. 5 metod nemělo v dokumentaci specifikaci protilátky vůči epitopům uvedenu vůbec, ačkoliv je tento požadavek součástí mezinárodních doporučení. Pregnantním projevem nesrovnatelnosti výsledků vlivem nerealizované standardizace jsou právě různé hodnoty cut-off u různých metod měření.

Primární referenční materiál pro cTnI NIST-SRM 2921 je sice dostupný, ale nemá patřičnou schopnost harmonizovat výsledky různých metod, je-li použit k jejich rekalibraci. Příčinou je již uvedená nedostatečná definice analytu.

Pracovní komise IFCC publikovala svou představu o dalším průběhu standardizace následovně:

- vývoj referenční metody s použitím protilátek, orientovaných k epitopům, vymežujícím nejstabilnější část cTnI
- kalibrace této metody na NIST-SRM 2921
- následné odvození sekundárních referenčních materiálů
- použití těchto sekundárních materiálů k odvození hodnot pracovních kalibrátorů.

Jde v podstatě jako vždy u řádné standardizace o ustanovení referenčního systému, sestávajícího z primárního referenčního materiálu a referenční metody měření, z něhož je možno odvodit porovnáním hodnoty pracovních kalibrátorů. Tedy o ustanovení měření s realizovanou metrologickou návazností a z toho plynoucí srovnatelností výsledků měření.

Analytická citlivost a klinické důsledky nesrovnatelnosti metod

Současným trendem ve vývoji metod (7) je neustálé snižování meze detekce a s tím související zvyšování analytické citlivosti a snižování hodnot 99 percentilu (Morrow a spol. 2009). V současnosti se hodnoty 99 percentilu pohybují již řádově v setinách $\mu\text{g/l}$ a v případě poslední generace cTnT dokonce v ng/l . Snaha o zvýšení citlivosti je klinicky oprávněná, neboť vede k zlepšování diagnostiky a prognózy stavu pacientů. Současně však otvírá řadu nových otázek a problémů v interpretaci. V budoucnu lze očekávat ještě další pokles meze detekce až o dva řády (4).

Nesrovnatelnost metod stanovení cTn má za následek různou schopnost detekce akutního koronárního syndromu (Tate a spol. 2008). Při použití stejného souboru 100 pacientů se výsledky nad hodnotu 99 percentilu, detekující akutní koronární syndrom, pohybovaly u osmi různých metod v intervalu 54 - 78 (8).

Experimentálně zjištěné hodnoty 99 percentilů, získané u 17 metod 14 různými autorskými kolektivy ukazují až dvojnásobné rozdíly (3) a evokují otázku vlivu výběru referenčních populací (Tate 2008).

Při použití poslední (ultrasenzitivní) generace metody Access Beckman (Eggers a spol. 2009) zjistili autoři významné diference v hodnotách cut off při použití dvou různých referenčních populací (9). Byla zjištěna závislost na přítomnosti akutního koronárního syndromu v anamnéze příslušníků referenční populace a také na pohlaví (u mužů byly zjištěny vyšší výsledky, než u žen).

Další autorský kolektiv sledoval klinickou citlivost a prognózu pacientů (počet přežití nemocných jedinců do doby 1 roku) dvěma moderními ultrasenzitivními metodami Access Beckman a Ultra Centaur Siemens (10) a zjistil významné rozdíly v klinické interpretaci mezi nimi (Venge a spol. 2009).

Biologická variabilita (proměnlivost)

Krátkodobé a dlouhodobé biologické variace cTnI sledovali a vyhodnotili s použitím metody Centaur Advia Siemens Ultra cTnI američtí autoři (Wu a spol. 2009). Krátkodobé variace byly hodnoceny v intervalu 0 až 4 hodin, dlouhodobé

v intervalu 0 až 8 týdnů (11). Vybraná populace se skládala se stejného počtu mužů a žen s nepřítomností srdečního onemocnění a s hladinami eGFR a BNP nad (eGFR) nebo pod (BNP) hodnoty cut off zdravé populace. Hodnota intraindividuální biologické variace CV_i (%) byla za při krátkodobém měření 9,7 % a při dlouhodobém sledování 14,0 %. Odpovídající hodnoty kritických diferencí mezi dvěma následnými měřeními jsou -32 % až 46 % při krátkodobém sledování a -45 % až 81 % při sledování dlouhodobém. V obou případech byly hodnoty indexu individuality (II) hluboko pod hodnotu 1,0 (II = 0,21 krátkodobě a II = 0,39 dlouhodobě). Tyto hodnoty indikují větší výpovědní hodnotu sledování změn cTnI v čase, než srovnání výsledku s hodnotou cut-off. Biologické variace cTnI jsou nižší, než u jiných kardiálních markerů (CRP, SAA, myeloperoxidáza, BNP, NTproBNP).

Sledování kardiálních markerů v praxi evropských klinických laboratoří

Průběžný dotazník pracovní komise EFCC byl rozeslán v květnu 2006. Osloveno bylo 980 laboratoří, ale pouze 220 odpovědělo (Pullki a spol 2009). Z toho bylo 95 % laboratoří zdravotnických zařízení s 24 hodinovým provozem. Doba odezvy do 60 minut byla dodržena jen v 49,5 % případech, šlo-li o „rutinní“ vyšetření a v 88,3 % případů, bylo-li vyšetření požadováno urgentně. 51 % účastníků stanovovalo cTnT, 49 % pak cTnI. 34 % respondentů provádělo ještě stanovení CK-MB (mass). To bylo více, než četnost vyšetření natriuretických peptidů, kde převládalo stanovení NT-proBNP (32 %) nad BNP (19 %). 21 % účastníků se neúčastnilo v plném rozsahu programů EHK, zejména pak programů pro sledování způsobilosti natriuretických peptidů. Více než 90 % účastníků používalo hodnot cut off, poskytnutých výrobcí.

Shrnutí

Analytická data metod stanovení troponinů se neustále mění. Zvyšuje se analytická citlivost metod, a to často v řádových dimenzích. Následně se naopak snižují hodnoty diagnostických rozhodovacích limitů. Proces není zdaleka uzavřený a je možné v budoucnu očekávat změny v analytické sensitivitě a následně v hodnotách mezí detekce a rozhodovacích limitů až o další dva řády. Stanovení cTnI není standardizované přestože je primární referenční materiál k dispozici.

Literatura

1.	Jaffe AS. The clinical impact of the universal diagnosis of myocardial infarction. Clin Chem Lab Med, 2008, 46 (11), 1485-1486.
2.	Thygesen T, Alpert JS, White HD. Joint ESC/ACCF/AHA WHF Task force for the redefinition of myocardial infarction. Universal definition of myocardial infarction. Eur Heart J, 2007, 28, 2525-38, Circulation 2007, 116, 2634-53, J Am Coll Cardiol 2007, 50, 2173-95.
3.	Tate JR. Troponin revisited 2008: assay performance. Clin Chem Lab Med, 2008, 46 (11) 1489-1500.
4.	Wu AH, Fukushima N, Puskas R a spol. Development and preliminary clinical validation of a high sensitivity assay for cardiac troponin using a capillary flow (single molecule) fluorescence detector. Clin Chem 2006, 52, 2157-2159).
5.	Panteghini M, Bunk DM, Christenson RA a spol. Standardization of troponin I measurements: an update. Clin Chem Lab Med 2008, 46 (11), 1501-1506.
6.	ISO/IEC Guide 99:2007. International vocabulary of metrology-basic and general concepts and associated terms (VIM). Dostupné na http://www.bipm.org
7.	Morrow DA, Antman EM. Evaluation of high-sensitivity assays for cardiac troponin. Clin Chem 2009, 55, 1, 5-8 Editorial.
8.	Tate JR, Ferguson W, Bais R a spol. The determination of 99 percentile level for troponin assays in an Australian reference population Ann Clin Biochem 2008, 45, 275-88).
9.	Eggers KM, Jaffe AS, Lind L a spol. Value of cardiac troponin I cutoff concentrations below 99th percentile for clinician decision-making. Clin Chem 2009, 55, 1, 85-92.
10.	Venge P, James S, Lindahl B. Clinical performance of two highly sensitive cardiac troponin I assays. Clin Chem 2009, 55, 1, 109-116.
11.	Wu AH, Lu QA, Todd J a spol. Short and long term biological variation in cardiac troponin I measured with a high sensitivity assay: implication for clinical practice. Clin Chem 2009, 55, 1, 52-58.
12.	Pulkki K, Surivissari J, Collinson P a spol. A pilot survey of the use and implementation of cardiac markers in acute coronary syndrome and heart failure across Europe. Clin Chem Lab Med 47 (2), DOI 101515. CCLM. 2009. 044 (in press).

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906