

Valutazione multicentrica del metodo Tosoh AIA-Pack[®] di 2^a generazione per la determinazione della troponina I cardiaca

Franca Pagani¹, Annalisa Iervasi², Francesca Stefini¹, Gianmatteo Micca³, Paolo Hoffer⁴, Marco Caputo⁵, Gian Carlo Zucchelli², Mauro Panteghini¹

¹ Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", Brescia

² Laboratorio Analisi, Istituto di Fisiologia Clinica-CNR, Pisa

³ Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Alba CN

⁴ Patologia Clinica, Ospedale Civile, Piove di Sacco PD

⁵ Laboratorio Analisi, Ospedale Civile "Borgo Trento", Verona

ABSTRACT

Multicenter evaluation of the Tosoh AIA-Pack 2nd-generation cardiac troponin I assay

Cardiac troponin I (cTnI) is a powerful tool for diagnosis of acute myocardial infarction. This necessitates the availability of highly specific, sensitive, and precise assays, thoroughly validated in well-designed studies. Here we describe the performance characteristics of the Tosoh AIA-Pack 2nd-generation cTnI immunoassay evaluated in a multicenter study. The protocol consisted of following sections evaluating analytical and preanalytical aspects: calibration stability, detection limit and imprecision, linearity, method comparison, sample stability, and anticoagulant interference. Reference values and the 10% CV cutoff for detecting myocardial necrosis were also defined. The minimum detectable cTnI concentration was 0.038 µg/L. Linearity of response was demonstrated along the entire dynamic range of the assay. The cTnI concentration corresponding to a total CV of 10% was 0.13 µg/L. cTnI values in heparin and EDTA plasma were on average ~15% and ~13% higher than in matched serum, respectively. cTnI, measured in 120 healthy individuals, was always undetectable. In conclusion, the AIA cTnI assay revealed acceptable analytical performance making it suitable for clinical applications.

RIASSUNTO

La troponina I cardiaca (cTnI) è ormai uno strumento irrinunciabile per la diagnosi di infarto acuto del miocardio. Per la sua determinazione devono quindi essere utilizzati metodi altamente specifici, sensibili e precisi, convalidati in studi scientificamente rigorosi. In questa valutazione multicentrica vengono descritte le caratteristiche del nuovo metodo AIA-Pack di 2^a generazione per la determinazione della cTnI. Il protocollo, riguardante aspetti analitici e preanalitici, è stato articolato nelle seguenti sezioni: stabilità della calibrazione, limite di rivelabilità e imprecisione, linearità, confronto tra metodi, stabilità del campione e interferenza da anticoagulanti. Sono stati inoltre studiati i valori di riferimento e calcolato il cutoff per la diagnosi di necrosi miocardica, corrispondente alla concentrazione di cTnI con un'imprecisione totale pari ad un CV del 10%. La concentrazione minima misurabile di cTnI è risultata 0.038 µg/L. La linearità della risposta è stata dimostrata per tutto l'intero intervallo dinamico del saggio. La concentrazione di cTnI misurabile con una imprecisione del 10% (CV totale) è risultata pari a 0.13 µg/L. I valori di cTnI in campioni di plasma (prelevati con eparina e con EDTA) sono risultati mediamente più elevati del 15% e del 13% rispetto al siero. La cTnI, misurata in 120 individui sani, è risultata sempre indosabile. Complessivamente, le prestazioni analitiche del metodo cTnI AIA-Pack si sono dimostrate accettabili e adatte alle applicazioni cliniche di questo marcatore biochimico.

INTRODUZIONE

La recente ridefinizione dei criteri biochimici per la diagnosi di infarto acuto del miocardio (IMA) è focalizzata sull'impiego della determinazione della concentrazione della troponina cardiaca nel sangue (1). Ciò implica la necessità di poter disporre di metodi altamente specifici, sensibili e precisi per la misura di questo marcatore (2). Soddisfare questa esigenza rappresenta indubbiamente una sfida non facile per la Medicina di Laboratorio, anche se i risultati ottenuti con i metodi di più recente introduzione evidenziano un sostanziale miglioramento delle prestazio-

ni analitiche (3). In questo studio multicentrico abbiamo valutato uno dei metodi di ultima generazione per la determinazione della troponina I cardiaca (cTnI), eseguito in automazione sull'analizzatore AIA 21 (Tosoh Bioscience, Rivoli TO).

MATERIALI E METODI

Durante lo studio, gli analizzatori AIA 21 e tutti i reagenti utilizzati sono stati impiegati seguendo le istruzioni del produttore. Come tipo di campione è stato utilizzato il siero fresco (se non diversamente specificato). Tutte le

misurazioni sono state effettuate in singolo (se non diversamente specificato).

Metodo AIA-Pack

Il metodo cTnI AIA-Pack di 2^a generazione è un saggio immunoenzimatico che impiega due anticorpi monoclonali: il primo, immobilizzato su particelle magnetiche, diretto verso gli amminoacidi 41-49 della molecola della cTnI ed il secondo, coniugato con la fosfatasi alcalina, diretto verso gli amminoacidi 87-91. Dopo l'incubazione con il campione (50 µL), le sfere magnetiche sono lavate per rimuovere l'anticorpo coniugato all'enzima non legato e incubate con il substrato 4-metilumbelliferilfosfato. La fosfatasi alcalina legata alle sfere converte il 4-metilumbelliferilfosfato a 4-metilumbelliferone che è fluorescente. L'intensità della fluorescenza misurata dall'analizzatore è direttamente proporzionale alla concentrazione di cTnI presente nel campione. Il primo risultato si ottiene dopo circa 20 minuti. La curva di calibrazione a 6 punti copre un intervallo di concentrazione che va da 0 a 120 µg/L. Una preparazione del complesso ternario umano cTnI-TnT-TnC è usata come standard per la calibrazione.

Stabilità della curva di calibrazione e limite di rivelabilità

La stabilità della calibrazione è stata valutata misurando i sei calibratori come campioni ogni quattro settimane per quattro mesi e confrontando i risultati ottenuti con la calibrazione effettuata in precedenza e memorizzata dal sistema. La minima concentrazione misurabile è stata stimata dal valore della concentrazione di cTnI corrispondente al segnale ottenuto come media di 20 replicati del calibratore 0, misurato come campione in un singolo esperimento, aumentata di 3 deviazioni standard.

Linearità alla diluizione

Quattro pool di sieri (a concentrazione di cTnI compresa tra 2.5 e 100 µg/L) sono stati progressivamente diluiti (1:2, 1:4, 1:8, e 1:16) con un pool di sieri a concentrazione di cTnI inferiore al limite di rivelabilità del metodo AIA-Pack o con la soluzione diluente fornita nel kit. Il campione non diluito e i campioni ottenuti per diluizione sono stati misurati in duplicato nella stessa seduta analitica. La curva ottenuta interpolando le concentrazioni misurate è stata poi testata per la linearità (4). Una volta dimostrata la linearità, è stata effettuata l'analisi della regressione lineare ed è stato calcolato il coefficiente di correlazione (r). È stato anche condotto un test di recupero.

Imprecisione e calcolo della concentrazione al CV del 10%

Seguendo quanto riportato nel documento NCCLS EP5-A (5), sono stati misurati in duplicato in 20 sedute analitiche effettuate in 20 giorni differenti i tre sieri di controllo per marcatori cardiaci LiquichekTM (Bio-Rad Laboratories, cat. no. 645), utilizzando due differenti lotti di reagenti e due diverse calibrazioni.

Al fine di ottenere il profilo di imprecisione nell'intervallo

di concentrazione basso, sono stati inoltre preparati (e conservati a -80°C fino al momento dell'uso) sette pool di sieri umani. Le concentrazioni di cTnI nei pool erano approssimativamente 0.02, 0.05, 0.10, 0.15, 0.25, 0.40, e 0.65 µg/L. I pool sono stati misurati in duplicato in ognuna di 20 sedute analitiche eseguite in 20 giorni, utilizzando due differenti lotti di reagenti (10 sedute per lotto) e due diverse calibrazioni. Per scongiurare un possibile effetto di trascinamento i pool sono stati di volta in volta misurati in modo casuale. Alla fine dell'esperimento per ogni pool è stato calcolato il CV totale e questo riportato contro la concentrazione media. Dal profilo di imprecisione così ottenuto è stata calcolata la concentrazione di cTnI corrispondente al CV del 10%.

Confronto tra metodi

Utilizzando sieri selezionati per rappresentare tutto l'intervallo di concentrazioni di cTnI che si riscontra nella pratica quotidiana, i valori di cTnI AIA sono stati confrontati con quelli ottenuti con i seguenti metodi: Access AccuTnITM (Beckman Coulter), AxSYMTM cTnI (Abbott), Dimension RxLTM cTnI (Dade Behring) e Vitros ECiTM cTnI (Ortho-Clinical Diagnostics). I dati sono stati analizzati con la regressione di Deming e con il grafico delle differenze.

Tipo e stabilità del campione

Per la valutazione del possibile effetto di anticoagulanti, sono stati analizzati campioni ottenuti da 53 pazienti con IMA, raccolti sia subito dopo la comparsa dei sintomi sia in fase più tardiva. Previa consenso informato, ai pazienti sono stati prelevati tre tipi diversi di campione durante la stessa flebotomia: siero (provette Terumo, cat. no. VPO54SAS), plasma eparinato (litio) (provette Terumo, cat. no. VP54SAHL) e plasma EDTA (provette Becton Dickinson, cat. no. 368856). La determinazione della cTnI è stata effettuata in duplicato su ognuno dei tre tipi di campioni nella stessa seduta analitica. La media dei risultati ottenuti nel plasma è stata confrontata con i corrispondenti valori di siero ed è stata determinata la significatività delle differenze (test della somma dei ranghi di Wilcoxon). Sono stati inoltre eseguiti l'analisi della regressione lineare e il grafico delle differenze.

Per la valutazione della stabilità della cTnI contenuta nel campione, tre sieri contenenti cTnI a concentrazione di 0.22 µg/L, 1.32 µg/L e 10.5 µg/L sono stati analizzati entro le due ore successive al prelievo (T₀). I campioni sono stati poi suddivisi in quattro aliquote: l'aliquota A è stata tenuta a temperatura ambiente e frazioni di questa sono state misurate dopo 8, 24 e 48 ore. Un'altra aliquota (B), conservata frazionata in frigorifero (+4 °C), è stata misurata dopo 24, 48 e 96 ore. La terza aliquota (C), mantenuta a -20 °C in più frazioni, è stata misurata dopo 2, 7, 14 giorni, 1 e 3 mesi. La quarta aliquota (D), mantenuta a -80 °C in più frazioni, è stata misurata dopo 1, 3 e 6 mesi. Tutte le misure sono state effettuate in duplicato. Il recupero di cTnI è stato calcolato come percentuale del valore iniziale ottenuto sul campione fresco, dividendo le concentrazioni ad ogni tempo di conservazione (T_n) per la

concentrazione al tempo T_0 . E' stata effettuata anche l'analisi statistica dell'andamento nel tempo.

Valori di riferimento

Per la stima dell'intervallo di riferimento, la cTnI è stata misurata in campioni di siero di 120 individui apparentemente sani (60 donne e 60 uomini di età compresa tra i 22 e gli 83 anni) selezionati "a priori" secondo i criteri di esclusione/inclusione contenuti nelle raccomandazioni IFCC (6).

RISULTATI

La curva di calibrazione era stabile per almeno quattro mesi. In particolare, i singoli calibratori misurati e confrontati con una curva di calibrazione eseguita 130 giorni prima mostravano un recupero di 96.3%-137.7 % dei valori nominali, con differenze statisticamente non significative ($p = 0.16$). Il limite di rivelabilità variava da 0.035 a 0.041 $\mu\text{g/L}$ (mediana, 0.038 $\mu\text{g/L}$; $n = 6$).

I risultati degli studi di linearità sono mostrati nella Tabella 1. Per tutti i campioni valutati, la risposta lineare era confermata.

L'imprecisione tra-serie e l'imprecisione totale (CV) dei tre campioni di controllo (valori medi: 0.32 $\mu\text{g/L}$, 2.67 $\mu\text{g/L}$ e 8.18 $\mu\text{g/L}$) erano rispettivamente comprese tra 3.5-6.5% e 4.4-8.2%. La Figura 1 mostra il profilo di imprecisione (CV% totale vs. pool a concentrazioni crescenti di cTnI) ottenuto con il metodo AIA-Pack. La concentrazione di cTnI misurabile con una imprecisione totale (CV) del 10%, calcolata per interpolazione sul profilo di imprecisione, è risultata pari a 0.13 $\mu\text{g/L}$.

Il confronto tra il metodo AIA-Pack e gli altri metodi commerciali ha prodotto un'ampia gamma di pendenze (valori compresi tra 0.15 e 1.86), peraltro attesa, in mancanza di standardizzazione metodologica (Figura 2). Nonostante la presenza di significativi scostamenti sistematici tra i diversi metodi, questi erano tra loro abbastanza ben correlati ($r > 0.96$).

Nella Figura 3 sono riportati i risultati del confronto tra campioni di siero e campioni di plasma ottenuti con diffe-

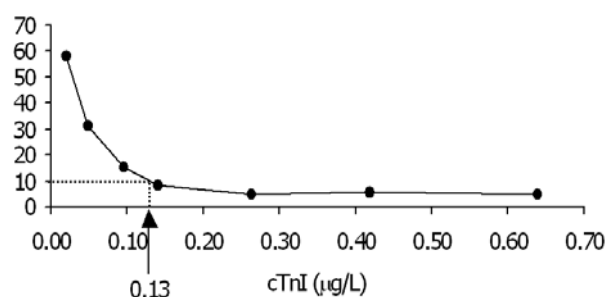


Figura 1

Risultati di imprecisione del metodo cTnI AIA-Pack ottenuti utilizzando pool di sieri umani.

La freccia indica la concentrazione di cTnI corrispondente alla imprecisione totale (CV) del 10%.

renti anticoagulanti. In media, la differenza (95% intervallo di confidenza) nei confronti del siero era 14.5% (11.1-17.8%; $p < 0.001$) per i campioni in eparina e 13.2% (7.9-18.6%; $p = 0.0001$) per i campioni raccolti con EDTA. La cTnI nei campioni di siero si manteneva stabile per almeno 48 ore a temperatura ambiente [media recupero (SE) 98.8% (0.9), $p > 0.5$], 4 giorni a 4 °C [media recupero (SE), 98.5% (1.5), $p > 0.6$], tre mesi a -20 °C [media recupero (SE), 94.3% (2.0), $p > 0.3$] e 6 mesi a -80 °C [media recupero (SE), 91.4% (1.8), $p > 0.07$].

Tutti i valori di cTnI ottenuti in volontari apparentemente sani erano al di sotto del limite di rivelabilità del metodo, ossia $< 0.04 \mu\text{g/L}$.

DISCUSSIONE

Malgrado gli indubbi vantaggi clinici, nella determinazione della cTnI permangono ancora alcuni ostacoli metodologici, quali la mancanza di standardizzazione, la diversa specificità anticorpale, le possibili interferenze, l'imprecisione e la sensibilità dei metodi, che possono significativamente limitarne l'impiego. In particolare, non sempre i

nuovi metodi introdotti in commercio sono corredati da tutte le informazioni relative a queste fonti di variabilità (3). Il presente studio di valutazione multicentrica del metodo cTnI AIA-Pack di 2^a generazione è stato condotto proprio con l'obiettivo di verificare le sue prestazioni in una condizione il più possibile vicina a quella routinaria.

Relativamente alla configurazione, la calibrazione del test è effettuata impiegando un materiale contenente la cTnI in forma com-

Tabella 1

Valutazione della linearità

ID campione	Concentrazione cTnI nativa, $\mu\text{g/L}$	Diluyente	F test	p^a	r	Recupero medio % (\pm SE)
1 BS	100.1	NSP ^b	9,18	0,10	0,9999	114,2 \pm 4,4
3 PD	26.9	MDL ^c	1,68	0,32	0,9997	112,2 \pm 3,2
3 PI	14.2	MDL	5,20	0,15	0,9995	98,8 \pm 1,4
1 PI	2.5	NSP	5,79	0,14	0,9998	102,0 \pm 2,6

^a L'ipotesi di risposta lineare è rigettata se $p < 0.05$.

^b NSP, pool di sieri cTnI negativo.

^c MDL, diluyente della ditta.

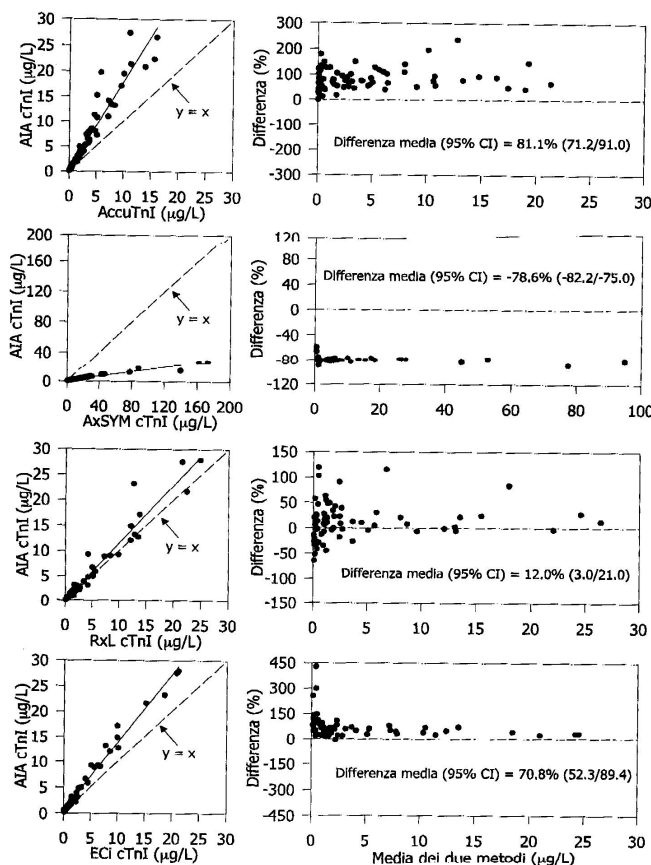


Figura 2
 Confronto fra metodi e grafico delle differenze (in percentuale).
 Le seguenti rette di regressione erano ottenute: $AIA=1.86 (\pm 0.29)AccuTnI - 0.04 (\pm 0.47)$ ($r=0.961$; $n=73$); $AIA=0.15 (\pm 0.03)AxSYM + 0.51 (\pm 0.40)$ ($r=0.977$; $n=41$); $AIA=1.18 (\pm 0.16)RxL - 0.09 (\pm 0.29)$ ($r=0.974$; $n=68$); $AIA=1.35 (\pm 0.08)ECi + 0.27 (\pm 0.17)$ ($r=0.993$; $n=58$).

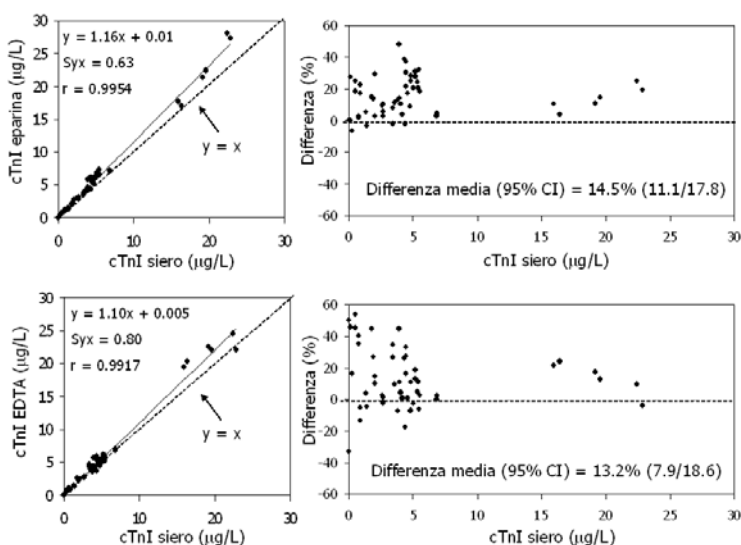


Figura 3
 Studi di correlazione e grafici delle differenze (in percentuale) tra campioni di siero e di plasma ($n=53$) misurati con il metodo AIA-Pack cTnI. CI, intervallo di confidenza.

plessata, come precedentemente raccomandato (7). Un complesso ternario cTnI-TnT-TnC è impiegato come materiale di calibrazione per ottenere una curva a 6 punti. Il metodo, inoltre, impiega due anticorpi monoclonali anti-cTnI che riconoscono epitopi localizzati nella parte stabile della molecola. Ciò è confermato dall'assenza di significativi effetti sulle concentrazioni di cTnI dopo la conservazione dei campioni a diverse temperature per tempi prolungati. Il metodo dimostrava linearità nella risposta analitica, senza deviazioni statisticamente significative per tutto l'intervallo dinamico di misura. Diluizioni differenti di vari campioni fornivano valori di cTnI essenzialmente identici, indicando assenza di sostanze interferenti nel campione biologico e testimoniando appropriate condizioni di misura (8).

L'imprecisione del metodo è stata valutata in due modi. Utilizzando sieri di controllo commerciali, si è dimostrata un'ottima precisione ($CV < 8.2\%$) a differenti livelli di concentrazione. Nel secondo esperimento è stato ottenuto il profilo di imprecisione del metodo, utilizzando il protocollo già raccomandato dall'IFCC, al fine di ottenere una indicazione il più possibile realistica sulla variabilità delle misure di cTnI, soprattutto per basse concentrazioni (9). Siccome tutte le raccomandazioni internazionali indicano come obiettivo un'imprecisione totale ($CV \leq 10\%$) alla concentrazione scelta come livello decisionale per la necrosi miocardica (1, 7), tale concentrazione è stata derivata dai dati ottenuti ed è risultata essere $0.13 \mu\text{g/L}$. A questo proposito è da sottolineare che questo valore è più alto di quello trovato nello studio coordinato dall'IFCC (che era pari a $0.09 \mu\text{g/L}$), nel quale era utilizzato lo stesso protocollo sperimentale, ma gli esperimenti erano effettuati direttamente dalla ditta produttrice, in condizioni probabilmente non del tutto assimilabili a quelle routinarie (9).

La cTnI in persone sane risultava indosabile con il metodo AIA-Pack, in analogia con quanto precedentemente pubblicato da Haugh e collaboratori (10). In un altro studio,

condotto però utilizzando una diversa strumentazione analitica, l'AIA 600 II, il metodo AIA-Pack si dimostrava in grado di misurare la cTnI in una piccola percentuale di individui sani (11). Aspetti quali i criteri di selezione degli individui e l'ampiezza del numero dei campioni vanno senz'altro considerati per spiegare questa differenza. Tuttavia, un ulteriore aspetto dovrebbe essere sottolineato. Nello studio di Apple et al. (11) venivano utilizzati campioni di plasma eparinato, che, come dimostrato nel nostro studio, possono produrre risultati significativamente più elevati rispetto al siero. L'impiego del plasma al posto del siero può essere molto utile perché elimina la necessità del tempo di coagulazione, riducendo quindi il tempo totale della fase preanalitica. Tuttavia, siccome ci possono essere differenze sostanziali nella concentrazione di cTnI tra campioni di siero e di plasma, l'uso di anticoagulanti dovrebbe essere studiato e validato attentamente prima di essere raccomandato nell'uso pratico (2, 7). Con il metodo AIA-Pack, i valori di cTnI nel plasma eparinato e nel plasma con EDTA erano in media circa 15 e 13% più elevati rispetto ai corrispondenti valori in siero e le differenze nei singoli campioni non erano interamente correggibili mediante l'introduzione di possibili fattori di calcolo. Il meccanismo alla base di questa interferenza positiva non è del tutto ipotizzabile con le attuali conoscenze scientifiche, visto che il ben conosciuto effetto dell'eparina nel "mascherare" la molecola di cTnI, diminuendone l'immunoreattività, e quello altrettanto noto dell'EDTA nel chelare il calcio e dividere il complesso troponinico calcio-dipendente, possono essere esclusi dal tipo di interferenza (positiva). Ulteriori studi saranno quindi necessari per spiegare il meccanismo di questa interferenza.

In conclusione, le prestazioni analitiche del metodo cTnI AIA-Pack di 2^a generazione si sono dimostrate accettabili e complessivamente adatte al suo impiego in campo clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. Alpert J, Thygesen K, for the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. 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.
2. Panteghini M. The measurement of cardiac markers. Where should we focus? *Am J Clin Pathol* 2002;118:354-61.
3. Panteghini M. Performance of today's cardiac troponin assays and tomorrow's. *Clin Chem* 2002;48:809-10.
4. Burnett RW. Quantitative evaluation of linearity. *Clin Chem* 1980;26:644-6.
5. NCCLS Approved Guideline EP5-A. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.
6. PetitClerc C, Solberg HE. IFCC approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:639-44.
7. Panteghini M, Gerhardt W, Apple FS, et al. Quality specifications for cardiac troponin assays. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). IFCC Scientific Division Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:174-8.
8. Jhang JS, Chang CC, Fink DJ, Kroll MH. Evaluation of linearity in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:44-8.
9. 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.
10. Haug C, Bachem MG, Woehrle H, Hetzel M, Gruenert A. Evaluation of two modified cardiac troponin I enzyme immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:837-9.
11. Apple FS, Quist HE, Doyle PJ, Otto AP, Murakami MM. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin Chem* 2003;49:1331-6.