

Valutazione del metodo di 2^a generazione Innotracc Aio! per la determinazione della troponina I cardiaca

Franca Pagani, Francesca Stefani, Mauro Panteghini

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

ABSTRACT

Evaluation of the Innotracc Aio!TM 2nd-generation cardiac troponin I assay

We evaluated the 2nd-generation cardiac troponin I (cTnI) assay performed on the Innotracc Aio! immunoanalyzer. The assay is based on "all-in-one" dry chemistry technology, in which all the reagents are pre-coated in assay cups (total analysis time of <20 min). The assay demonstrated a detection limit of 0.006 µg/L. Five cTnI-positive sera (native cTnI, 5 to 80 µg/L) were tested for linearity. For all samples, the hypothesis of a linear fit was accepted. In the imprecision study, the following results were obtained (mean cTnI, µg/L, and total CV): 0.019, 14.2%; 0.044, 8.2%; 0.065, 6.3%; 0.086, 6.3%; 0.14, 8.1%; 0.22, 6.0%; 0.39, 4.3%. Since a total CV ≤10% at the decision limit for myocardial infarction is recommended, the cTnI concentration corresponding to this imprecision was also derived (0.036 µg/L). 97% of cTnI values in 150 healthy subjects were <0.01 µg/L. The calculated 99th percentile of the value distribution was 0.015 µg/L. The Aio! 2nd-generation cTnI assay revealed improved performance and was close to meet the 10% CV at 99th percentile value, demonstrating a 10%/99th ratio of 2.4.

RIASSUNTO

In questo lavoro è stato valutato il metodo di 2^a generazione per la determinazione della troponina I cardiaca (cTnI), eseguito su analizzatore Innotracc Aio!. Il metodo si basa su una tecnologia di chimica secca, definita "all-in-one" ("tutto in uno", Aio), nella quale tutti i reagenti sono già presenti nelle coppette di reazione e la reazione rivelatrice è fluorimetrica (tempo totale di analisi <20 min). Il metodo ha mostrato un limite di rivelabilità pari a 0,006 µg/L. Per tutti i 5 campioni analizzati era confermata la linearità della risposta alla diluizione. Nell'esperienza di valutazione dell'imprecisione erano ottenuti i seguenti risultati (concentrazione media di cTnI e CV totale): 0,019 µg/L, CV 14,2%; 0,044 µg/L, CV 8,2%; 0,065 µg/L, CV 6,3%; 0,086 µg/L, CV 6,3%; 0,14 µg/L, CV 8,1%; 0,22 µg/L, CV 6,0%; 0,39 µg/L, CV 4,3%. Era quindi costruito il profilo di imprecisione e da esso era derivata la concentrazione di cTnI corrispondente al CV del 10%, che era pari a 0,036 µg/L. Nel gruppo di riferimento studiato (n=150), il 97% dei valori di cTnI era <0,01 µg/L e la concentrazione di cTnI pari al 99° percentile della distribuzione dei valori era 0,015 µg/L, con un rapporto concentrazione con CV 10%/limite superiore di riferimento di 2,4.

INTRODUZIONE

La troponina cardiaca è stata recentemente indicata dai comitati scientifici internazionali come il marcatore biochimico di scelta per la diagnosi di infarto miocardico acuto (IMA) (Tabella 1) (1, 2). Se da una parte è noto che l'impiego della troponina come principale criterio diagnostico, più sensibile e specifico dei precedenti, possa portare ad un aumento medio del numero di IMA pari al 20-30% nel gruppo di pazienti affetti da sindrome coronarica acuta, è altrettanto vero che la percentuale di pazienti che, in base ai nuovi criteri, vengono ricategorizzati da angina ad IMA è anche significativamente dipendente dalle prestazioni del metodo usato per la determinazione della troponina stessa (3-5). Dati recentemente pubblicati confermano una notevole diversità tra metodi di determi-

Tabella 1

Consenso 2000: marcatori cardiaci e infarto miocardico acuto (IMA)

- Il marcatore di scelta è la troponina cardiaca;
- Se la troponina non è disponibile, la migliore alternativa è rappresentata dalla CK-MB (misurata in concentrazione proteica);
- CK, AST e LDH non devono essere più utilizzate a questo scopo;
- La mioglobina dovrebbe essere considerata per la diagnosi rapida di esclusione di IMA;
- L'aumento della troponina indica danno miocardico, ma non può differenziarne il meccanismo;
- Essendo il grado di aumento del marcatore proporzionalmente correlato al rischio clinico, è consigliato per il suo impiego un unico livello decisionale.

Il presente lavoro è stato in parte presentato durante il 36° Congresso Nazionale SIBioC, 8-11 giugno 2004, Padova (Biochim Clin 2004;28:163).

nazione delle troponine cardiache riguardo ad importanti aspetti analitici, primo fra tutti l'imprecisione dei metodi di determinazione (6, 7). Sebbene una più alta precisione analitica a più basse concentrazioni di troponina non corrisponda automaticamente ad una più alta sensibilità clinica nella rilevazione del danno miocardico, l'impiego di metodi per la determinazione della troponina ad alta sensibilità potrebbe condurre all'identificazione di una sostanzialmente maggiore proporzione di pazienti con IMA in confronto a metodi di determinazione meno sensibili e precisi (5).

Da questo punto di vista, i risultati ottenuti con i più recenti test di nuova generazione mostrano che vi è un sostanziale miglioramento nella performance analitica offerta (8). In questo lavoro è stato valutato uno di questi test di nuova generazione per la determinazione della troponina I cardiaca (cTnI), eseguito su analizzatore Innotrac Aio! (A. De Mori Strumenti, Milano), mediante la definizione delle sue principali caratteristiche (limite di rivelabilità, linearità, imprecisione, valori di riferimento e livello decisionale per la diagnosi di IMA), secondo quanto raccomandato dalla IFCC (9).

MATERIALI E METODI

Strumentazione e metodo

Il metodo si basa su una tecnologia di chimica secca, definita "all-in-one" ("tutto in uno", Aio), nella quale tutti i reagenti sono già presenti nelle coppette di reazione e la reazione rivelatrice è fluorimetrica (10). Il tutto è completamente automatizzato su analizzatore Innotrac Aio! con un tempo totale di analisi inferiore a 20 minuti (11). Per ciascun lotto di reagente, una curva di calibrazione ad 8 punti è fornita su codice a barre dalla ditta produttrice e la verifica della stessa calibrazione è effettuata mediante l'impiego di apposite coppette ("calibration pen"). Come campione (volume 20 µL) può essere utilizzato sangue intero, plasma oppure siero (12). Una preparazione purificata da cuore umano del complesso troponinico ternario TnI-TnT-TnC è impiegata come calibratore (13, 14), mentre la configurazione anticorpale del test associa un anticorpo monoclonale con un epitopo nella regione N-terminale della cTnI ed uno con un epitopo nella regione C-terminale a due anticorpi prodotti verso il frammento intermedio stabile della cTnI (15).

Protocollo

Nel corso dello studio l'analizzatore Aio! era utilizzato seguendo le istruzioni fornite dal produttore stesso. Se non diversamente indicato, come campione era impiegato siero fresco.

Limite di rivelabilità. La minima concentrazione dosabile di cTnI è stata valutata mediante l'analisi di 20 replicati del diluente privo di cTnI in una singola serie e definita come la concentrazione di cTnI corrispondente al segnale medio più 3 DS di questo campione (9).

Linearità. Per lo studio della linearità sono state effettuate diluizioni seriate di cinque campioni di siero conte-

nenti cTnI con concentrazioni da ~5 µg/L a ~80 µg/L mediante pool di sieri contenenti concentrazioni indosabili di cTnI (inferiori al limite di rivelabilità del metodo) oppure mediante la soluzione tampone dello strumento. Il campione non diluito e quattro diverse diluizioni (3:4, 1:2, 1:4, 1:8) erano determinate in duplicato nella stessa serie analitica. La curva ottenuta era valutata per la linearità come suggerito da Burnett (16). Dopo aver dimostrato la linearità, era effettuata un'analisi dei dati mediante regressione lineare e calcolato il coefficiente di correlazione. Infine, era anche effettuata una valutazione del recupero alle varie diluizioni.

Imprecisione. Per la valutazione dell'imprecisione sono stati preparati sette pool di sieri con concentrazioni di cTnI comprese tra 0,02 µg/L e 0,40 µg/L. I pool erano aliquotati e conservati a -80 °C fino al momento dell'impiego. I campioni erano analizzati in duplicato in ciascuna serie analitica, una volta al giorno per 20 giorni, utilizzando due lotti di reattivo e due differenti calibrazioni (7). Mediante l'analisi della varianza è stato calcolato il CV totale alle diverse concentrazioni e i valori di CV così ottenuti per i diversi campioni sono stati utilizzati per costruire il profilo di imprecisione del metodo (7).

Valori di riferimento. Per lo studio dei valori di riferimento erano selezionati 'a priori' 150 soggetti apparentemente sani (75 uomini e 75 donne; età mediana, 60 anni; intervallo tra 23 e 89 anni) usando i criteri di esclusione/inclusione suggeriti nelle raccomandazioni sulla teoria dei valori di riferimento dell'IFCC (17). Sulla distribuzione dei valori di cTnI ottenuti in questa popolazione era calcolata, mediante analisi statistica non parametrica, la concentrazione corrispondente al 99° percentile.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il metodo ha mostrato un limite di rivelabilità pari ad una concentrazione di cTnI di 0,006 µg/L. La Tabella 2 mostra i risultati delle prove di linearità. Per tutti i campioni analizzati era confermata l'ipotesi di un andamento lineare della risposta alla diluizione ($p > 0,10$). I coefficienti di correlazione (r) erano $> 0,9989$ quando la diluizione era eseguita con pool di sieri negativo e $> 0,9978$ quando la diluizione era eseguita con tampone. Con l'eccezione delle due più alte diluizioni (1:4 e 1:8) del campione S2, che fornivano recuperi compresi tra 82% e 88%, tutte le percentuali di recupero erano entro $\pm 10\%$ delle concentrazioni native. I risultati confermavano quindi la linearità della risposta analitica, mostrando l'assenza di sostanze endogene potenzialmente interferenti nel metodo e testimoniando appropriate condizioni di misura (18). L'impiego di un pool di sieri cTnI-negativo per la diluizione sembrava fornire risultati leggermente migliori, consigliandone l'eventuale uso in caso di necessità di diluizione di campioni con concentrazioni di cTnI oltre il limite superiore della curva di calibrazione (100 µg/L).

Nell'esperimento di valutazione dell'imprecisione erano ottenuti i seguenti risultati (concentrazione media di cTnI e CV totale): 0,019 µg/L, CV 14,2%; 0,044 µg/L, CV

Tabella 2
Valutazione della linearità^a

ID campione	Origine	Concentrazione cTnI nativa, µg/L	F test ^b	F test ^c	p ^b	p ^c	r ^b	r ^c	Recupero medio % (± SE) ^b	Recupero medio % (± SE) ^c
S1	Siero fresco/singolo donatore	79,5	3,75	0,48	0,20	0,56	0,9990	0,9978	99,6 ± 2,4	9 4,3 ± 2,9
S2	Siero congelato/singolo donatore	46,9	0,41	0,68	0,59	0,50	0,9989	0,9996	91,0 ± 3,7	89,7 ± 4,1
S3	Siero congelato/singolo donatore	27,6	8,11	0,03	0,11	0,85	0,9992	0,9990	97,2 ± 1,2	96,0 ± 2,8
S4	Pool di sieri congelato	9,2	1,16	6,48	0,40	0,13	0,9999	1,0000	95,2 ± 1,9	97,4 ± 1,7
S5	Siero congelato/singolo donatore	4,3	0,69	0,08	0,49	0,79	0,9995	0,9987	99,4 ± 1,8	98,0 ± 2,4

^a L'ipotesi di risposta lineare è rigettata se p<0,05

^b Diluizione con pool di sieri cTnI negativo

^c Diluizione con soluzione tampone

8,2%; 0,065 µg/L, CV 6,3%; 0,086 µg/L, CV 6,3%; 0,14 µg/L, CV 8,1%; 0,22 µg/L, CV 6,0%; 0,39 µg/L, CV 4,3%. In base a quanto raccomandato dalle società scientifiche internazionali, al livello decisionale per la diagnosi di necrosi miocardica con l'impiego della troponina si dovrebbe associare un'imprecisione totale (espressa come CV) non superiore al 10% (9). Dal profilo di imprecisione costruito con i risultati sopra riportati era quindi derivata la concentrazione di cTnI corrispondente al CV del 10%, che era pari a 0,036 µg/L (Figura 1).

Nel gruppo di riferimento studiato il 97% dei valori di

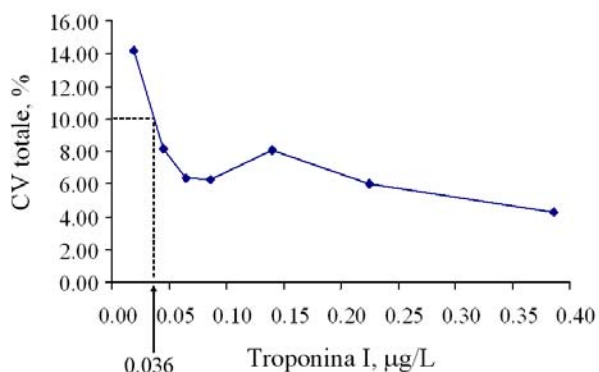


Figura 1
Profilo di imprecisione del metodo Innotrac Aio! di 2^a generazione per la determinazione della troponina I cardiaca (cTnI). La freccia indica la concentrazione di cTnI misurabile con un CV totale del 10% (0,036 µg/L).

cTnI era <0,01 µg/L. Quattro soggetti (due maschi e due femmine) mostravano concentrazioni misurabili di cTnI (da 0,010 a 0,029 µg/L). La concentrazione di cTnI pari al 99° percentile della distribuzione dei valori era 0,015 µg/L, con un intervallo di confidenza (90%) di 0,014-0,016 µg/L. E' quindi chiaro che l'impiego come livello decisionale di una concentrazione pari a 0,036 µg/L, alla quale il metodo in esame fornisce un'adeguata imprecisione e che è pari a 6 volte il limite di rivelabilità e a 2,4 volte il limite superiore di riferimento, può ampiamente garantire dal pericolo di ottenere risultati erronei nella classificazione clinica dei pazienti, dovuti ad una elevata imprecisione analitica a concentrazioni troppo basse ed alla conseguente incapacità di discriminare un piccolo aumento di concentrazione della cTnI dal semplice rumore di fondo del test (Tabella 3) (9, 19).

Tabella 3
Riassunto delle concentrazioni rilevanti relative al metodo di 2^a generazione Innotrac Aio! per la determinazione della troponina I cardiaca (cTnI)

	Limite di rivelabilità (LR)	Limite superiore di riferimento (LSR) (99° percentile)	Concentrazione con CV=10%
cTnI, µg/L	0,006	0,015	0,036
Volte x LR	1	2,5	6,0
Volte x LSR	-	1	2,4

In conclusione, il metodo Innotrac Aio! di 2^a generazione per la determinazione della cTnI ha mostrato un comportamento senz'altro migliore se confrontato con i dati precedentemente ottenuti con il corrispondente metodo di 1^a generazione (12). E' importante soprattutto il fatto che il metodo mostri un rapporto tra la concentrazione di cTnI con CV 10% e quella pari al 99° percentile della distribuzione di riferimento attorno a 2, assimilabile a quanto ottenuto con i metodi che attualmente forniscono le migliori prestazioni analitiche (7).

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. *Eur Heart J* 2000;21:1502-13.
2. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the management of patients with unstable angina). *J Am Coll Cardiol* 2000;36:970-1062.
3. Koukkunen H, Penttilä K, Kempainen A, Penttilä I, Halinen MO, et al. Differences in the diagnosis of myocardial infarction by troponin T compared with clinical and epidemiologic criteria. *Am J Cardiol* 2001;88:727-31.
4. Kontos MC, Fritz LM, Anderson FP, Tatum JL, Ornato JP, Jesse RL. Impact of the troponin standard on the prevalence of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2003;146:446-52.
5. Ferguson JL, Beckett GJ, Stoddart M, Walker SW, Fox KAA. Myocardial infarction redefined: the new ACC/ESC definition, based on cardiac troponin, increases the apparent incidence of infarction. *Heart* 2002;88:343-7.
6. Panteghini M. The measurement of cardiac markers. Where should we focus? *Am J Clin Pathol* 2002;118:354-61.
7. Panteghini M, Pagani F, Yeo KTJ, Apple FS, Christenson RH, et al. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem* 2004;50:327-32.
8. Panteghini M. Performance of today's cardiac troponin assays and tomorrow's. *Clin Chem* 2002;48:809-10.
9. Panteghini M, Gerhardt W, Apple FS, Dati F, Ravkilde J, et al. Quality specifications for cardiac troponin assays. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). *Clin Chem Lab Med* 2001;39:174-8.
10. Lövgren T, Meriö L, Mitrunen K, Mäkinen ML, Mäkelä M, et al. One-step all-in-one dry reagent immunoassays with fluorescent europium chelate label and time-resolved fluorometry. *Clin Chem* 1996;42:1196-201.
11. Pettersson K, Katajamaki T, Irjala K, Leppanen V, Majamaa-Voltti K, Laitinen P. Time-resolved fluorometry (TRF)-based immunoassay concept for rapid and quantitative determination of biochemical myocardial infarction markers from whole blood, serum and plasma. *Luminescence* 2000;15:399-407.
12. Hedberg P, Valkama J, Puukka M. Analytical performance of time-resolved fluorometry-based Innotrac Aio!™ cardiac marker immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63:55-64.
13. Katrukha A, Bereznikova A, Pettersson K. New approach to standardization of human cardiac troponin I (cTnI). *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(suppl 230):124-7.
14. Christenson RH, Apple F, Bodor G, Bunk D, Dalluge J, et al. Standardization of cardiac troponin I assays: round robin of ten candidate reference materials. *Clin Chem* 2001;47:431-7.
15. Eriksson S, Junikka M, Laitinen P, Majamaa-Voltti K, Alftan H, Pettersson K. Negative interference in cardiac troponin I immunoassays from a frequently occurring serum and plasma component. *Clin Chem* 2003;49:1095-104.
16. Burnett RW. Quantitative evaluation of linearity. *Clin Chem* 1980;26:644-6.
17. 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.
18. Jhang JS, Chang CC, Fink DJ, Kroll MH. Evaluation of linearity in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:44-8.
19. Sheehan P, Blennerhassett J, Vasikaran SD. Decision limit for troponin I and assay performance. *Ann Clin Biochem* 2002;39:231-6.