

Prestaties van de Bayer cardiaal troponine-I-bepaling op de Advia Centaur

D. TELTING¹, Y. FOOLEN², R. MICHELS² en A.P.M. SCHELLEKENS¹

De precisie van de troponine-I (cTnI)-bepaling op een Advia Centaur (Bayer) werd bepaald. Bij lage concentratie cTnI (0,35 µg/l) was de precisie (VC van 9,0%) vergelijkbaar met de precisie gerapporteerd in de literatuur (VC van 10% bij 0,32 µg/l). Bij het 99^{ste} percentiel voor cTnI werd een precisie van 22% gerapporteerd. De matige precisie kan nadelige consequenties hebben voor de betrouwbaarheid van de test bij uitslagen rond de referentiewaarde. De cTnI assay van Bayer werd vervolgens vergeleken met de troponine-T (cTnT)-stripbepaling van Roche Diagnostics. Wanneer een afkappunt van 0,16 µg/l cTnI werd gehanteerd, dan was 98,8% van de cTnT-positieve monsters eveneens positief in de cTnI assay. Verder liet 59,0% van de cTnT-negatieve monsters een eveneens negatieve cTnI zien. Bij 12 patiënten met cardiale klachten werd een positieve cTnI-uitslag verkregen, terwijl de bijbehorende cTnT-uitslag negatief was. De assay van Bayer lijkt hierdoor gevoeliger dan de assay van Roche.

Trefwoorden: coronaire syndromen, troponine, Advia Centaur, Bayer

In een recent uitgebracht consensusdocument van de "European Society of Cardiology" (ESC) en het "American College of Cardiology (ACC)" werd het begrip myocardinfarct (MI) geherdefinieerd (1). MI is volgens dit document het afsterven van hartspierweefsel -hoe gering dan ook- ten gevolge van ischemie. Necrose van hartspierweefsel zal zich onder andere uiten door het vrijkomen van biochemische merker moleculen uit de hartspier in de circulatie van de patiënt. Voor de detectie van ischemische schade aan de hartspier was tot voor kort een aantal biochemische merkers gangbaar, waaronder ASAT, CK-MB, myoglobine en cardiale troponines (cTn). De ESC/ACC-richtlijnen spreken voor één van deze bepalingen een voorkeur uit, namelijk de cTn-bepaling (I- of T- subunit) en wel vanwege de absolute specificiteit voor hartspierschade, gecombineerd met een hoge diagnostische sensitiviteit. Een verhoogde

troponinewaarde zou volgens de aanbevelingen moeten worden gedefinieerd als een uitslag die het 99^{ste} percentiel van een referentiegroep te boven gaat. De maximaal aanvaardbare variatiecoëfficiënt (VC) bij deze grens is door de ESC/ACC op arbitraire gronden op 10% gesteld (1, 2). Op dit moment zijn er slechts enkele commercieel verkrijgbare assays die hieraan voldoen (3). De huidige cTnI assays zijn helaas weinig gestandaardiseerd en laten grote verschillen zien in uitkomst en precisie (4, 5). Het ruime aanbod aan verschillende assays van diverse fabrikanten onderstreept het belang om de prestaties van de methoden onderling te kunnen vergelijken met behulp van de vakliteratuur en de klinische diagnose.

Recent werd bij ons de bepaling voor cTnI op een Advia Centaur (Bayer) geïntroduceerd. De cTnI-bepaling op de Advia Centaur is een "sandwich" immunoassay voor de bepaling van cTnI in serum en in heparineplasma (6). Een geit-polykonaal anti-troponine-I-antilichaam gelabeld met een acridiniumester wordt gebruikt voor een chemoluminescentiereactie, terwijl een "vaste fase" bestaat uit een muis-monokonaal anti-troponineantilichaam gekoppeld aan paramagnetische deeltjes. Bij de introductie van de assay op ons laboratorium werden wij geconfronteerd met het volgende probleem. De fabrikant doet opgaaf van de precisie van de assay, echter slechts bij cTnI-concentraties vanaf 0,87 µg/l (6). Deze concentraties liggen ver boven het door de fabrikant opgegeven 99^{ste} percentiel van ≤ 0,07 µg/l en het in recente literatuur beschreven 99^{ste} percentiel van 0,16 µg/l (7). Een troponinewaarde boven het 99^{ste} percentiel zou volgens de nieuwe ESC/ACC-richtlijnen moeten worden opgevat als indicatief voor een myocardinfarct. De nieuwe richtlijnen hebben hierdoor consequenties voor het diagnostische afkappunt dat in het meest gunstige geval zo dicht mogelijk bij het 99^{ste} percentiel zal worden gekozen. Door ons werd de VC van de Bayer cTnI assay bij lage cTnI-concentraties (tot 3,29 µg/l) bepaald.

De cTnI assay van Bayer werd tevens vergeleken met een bij ons in gebruik zijnde semi-kwantitatieve cardiaal-troponine-T (cTnT)-bepaling van de firma Roche Diagnostics. De strip assay van Roche voor de bepaling van cTnT maakt gebruik van twee monoklonale antistoffen gericht tegen cTnT (8). Eén antilichaam is goud-gelabeld, terwijl het ander is gebiotinylerd. De antilichamen vormen een complex met cTnT, aanwezig in een volbloedmonster. Het cTnT-antilichaamcomplex verschijnt in de detectiezone als

Algemeen Klinisch Laboratorium¹ en Afdeling Cardiologie², Catharina-Ziekenhuis, Eindhoven

Correspondentie: Dr. D. Telting, AKL Catharina-Ziekenhuis, Postbus 1350, 5602 ZA Eindhoven
e-mail: AKLDTG@Catharina-Ziekenhuis.nl

een rood streepje, waarvan de intensiteit gerelateerd is aan de concentratie cTnT in het monster. De kwantificering van de intensiteit van het streepje is mogelijk met behulp van de bijbehorende Cardiac Reader. Dit "stripleesapparaat" rapporteert cTnT-concentraties tussen de 0,10 µg/l en 2,00 µg/l met een getal. Lagere concentraties cTnT worden gerapporteerd als negatief, terwijl hogere concentraties worden gerapporteerd als positief, >2,00 µg/l. Dit manuscript beschrijft de resultaten van deze studie naar de prestaties van de Bayer cTnI assay.

Materiaal en Methode

Precisie van de cTnI-bepaling

Wij bepaalden de precisie van de Bayer cTnI-bepaling door gebruik te maken van gepoold heparineplasma met verschillende cTnI-concentraties. In overeenstemming met het NCCLS-EP10-protocol (9) werden drie plasmapools (cTnI-concentratie van 0,14 µg/l, 1,72 µg/l en 3,29 µg/l) gedurende 10 dagen in duplo bepaald. Uitgaande van deze gegevens werd de totale precisie berekend. Tevens werd conform NCCLS-EP5-protocol (10) de totale precisie en de binnenrunprecisie bepaald, gebruik makend van drie andere heparineplasmapools (concentraties cTnI van 0,35 µg/l, 0,88 µg/l en 2,37 µg/l). Bij het EP5-protocol werden drie plasmapools gedurende 20 dagen, dagelijks in twee afzonderlijke series in duplo gemeten. De door ons bepaalde precisie werd vergeleken met de opgaaf van de fabrikant (6) en met gegevens uit de literatuur (7, 11).

Vergelijking van de cTnI-bepaling met de cTnT-bepaling

De cTnI assay van Bayer werd door ons vergeleken met de cTnT strip assay van Roche, waarbij gebruik werd gemaakt van met heparine ontstold volbloed voor beide assays. De assays van Bayer en Roche richten zich op twee verschillende subunits van het troponinecomplex. Toch heeft een vergelijking van de uitkomst van beide testen diagnostische betekenis, beide troponinesubunits komen immers met een overeenkomstig mechanisme -cardiale ischemie en de daar op volgende necrose van hartspierweefsel - in de circulatie. Een verhoging van de plasma-cTnI-concentratie gaat dus samen met een verhoging van de plasma-cTnT-concentratie (5). De vergelijking werd uitgevoerd volgens een NCCLS-EP9-protocol (12), er werden 120 monsters van zowel cardiologische patiënten (95) als controles (25) onderworpen aan de cTnT én de cTnI assay.

Resultaten

Precisie van de cTnI-bepaling

De door ons gevonden totale precisie en binnenrunprecisie is, tezamen met de opgaaf van de fabrikant, weergegeven in tabel 1. In een concentratie-precisieplot (figuur 1) werd de totale precisie, zoals bepaald met het EP5- en EP10-protocol, vergeleken met gegevens uit een studie van Stiegler et al. (11) en van Armstrong et al. (7).

Tabel 1. Resultaten van het EP5- en EP10-protocol vergeleken met de opgaaf van Bayer. Middels een EP10-protocol is alleen de totale VC te berekenen.

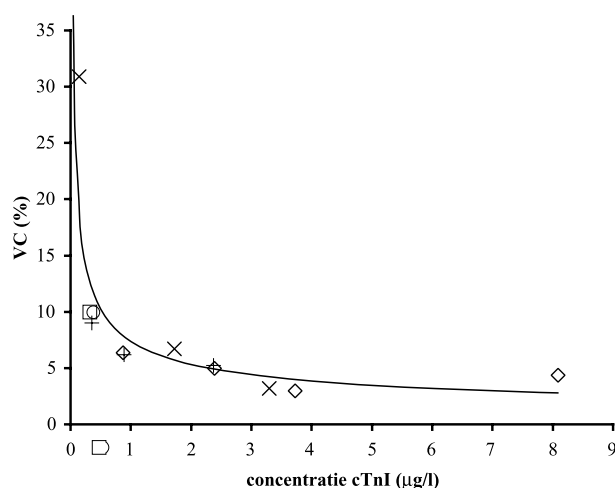
| Gemiddelde [cTnI] (µg/l) | Binnenrun-VC (%) | Totale VC (%) | Protocol |
|--------------------------|------------------|---------------|----------|
| 0,14 ¹ | – | 30,9 | EP10 |
| 0,35 ¹ | 5,5 | 9,0 | EP5 |
| 0,87 ² | 4,3 | 6,4 | onbekend |
| 0,88 ¹ | 3,9 | 6,2 | EP5 |
| 1,72 ¹ | – | 6,7 | EP10 |
| 2,37 ¹ | 3,3 | 5,2 | EP5 |
| 2,38 ² | 2,3 | 5,0 | onbekend |
| 3,29 ¹ | – | 3,2 | EP10 |
| 3,72 ² | 2,6 | 3,0 | onbekend |

¹ Bepaald door het Algemeen Klinisch Laboratorium, CZ Eindhoven

² Opgaaf Bayer

Vergelijking van de resultaten van cTnI- en cTnT-bepalingen

In de onderzochte patiëntenpopulatie werden cTnI-concentraties in een bereik van 0 tot 300 µg/l gevonden. Tijdens deze studie hadden wij niet de beschikking over een referentiewaarde van een door eens zelf geselecteerde referentiepopulatie. Voor deze studie hebben wij daarom gebruik gemaakt van een afkappunt van 0,16 µg/l gebaseerd op de hoogste in de literatuur gerapporteerde referentiewaarde (7). Middels interpolatie van de gegevens in figuur 1 werd de VC bij een cTnI-concentratie van 0,16 µg/l door ons op 20% geschat. Bij toepassing van dit afkappunt waren 24 monsters uit de onderzochte populatie negatief voor coronaire schade (tabel 2). Met de cTnT-bepaling werd bij 39 monsters de uitslag "negatief" verkregen. Bij 81 monsters werd bij de cTnT assay een positieve uitslag verkregen, waarvan bij 40 een uitslag met een getal (cTnT tussen 0,10 en 2,00 µg/l).



Figuur 1. Concentratie-precisie-plot. Verklaring van de gebruikte symbolen; x: bepaald door het AKL middels EP10 protocol, +: bepaald door het AKL middels EP5 protocol, ◇: opgaaf van Bayer, □: volgens Armstrong et al (7), ○: volgens Stiegler et al. (11). Bij de "op het oog" toegevoegde lijn is gebruik gemaakt van alle punten.

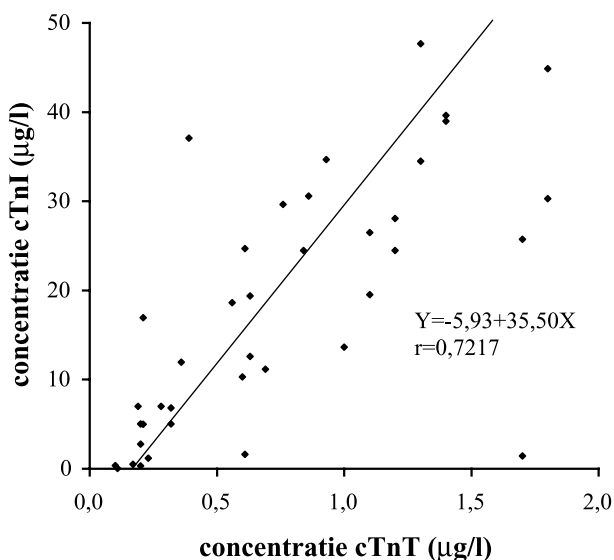
Van de positieve cTnT-monsters waren er 80 (98,8 %) eveneens positief in de cTnI assay. Van de negatieve cTnT-monsters waren er 23 (59,0%) eveneens negatief met de cTnI assay. Bij 16 monsters (12 patiënten) werd een positieve cTnI-uitslag gevonden terwijl de bijbehorende cTnT-uitslag negatief was. De hoogste cTnI-uitslag die hierbij werd gevonden bedroeg 26,41 µg/l (tabel 3). Evaluatie van de klinische gegevens van deze patiënten wees uit dat 11 patiënten van deze groep reeds een cardiologische voorgeschiedenis hadden. Ook de opnamediagnose wees in deze gevallen op een "cardiale problematiek". Bij twee patiënten ontstond de discrepantie tussen cTnI en cTnT pas op de 5^e, respectievelijk 18^e, dag na het myocardinfarct. Bij één patiënt werd een positieve cTnT-uitslag verkregen (cTnT 0,11 µg/l) terwijl de bijbehorende cTnI-uitslag negatief was (cTnI 0,02 µg/l).

De gegevens van de cTnT-bepaling tussen 0,10 en 2,00 µg/l en de uitkomst van de cTnI-bepaling werden middels Passing-en-Bablok-regressieanalyse met elkaar vergeleken (figuur 2). De vergelijking van de cTnI- en cTnT-waarden liet een matige correlatie tussen de twee bepalingen zien ($r = 0,7217$).

Conclusies en discussie

De analytische prestatie van de cTnI-bepaling op een Advia Centaur (Bayer) werd bepaald. De gevonden totale precisie en binnenrunprecisie liggen goed in lijn met de opgaaf van de fabrikant (tabel 1). Ook is de door ons gevonden precisie overeenkomstig met de gegevens van Armstrong et al. (7) en Stiegler et al. (11).

Volgens de opgaaf van de fabrikant zou het 99^{ste} percentiel bij $\leq 0,07$ cTnI µg/l liggen. Bayer doet echter geen opgaaf van de precisie van de bepaling bij deze concentratie (6). Uit onze gegevens is middels extrapolatie af te leiden dat de VC bij 0,07 µg/l veel groter zal zijn dan 30%. De precisie van 30% werd door ons immers al bij een cTnI-concentratie van 0,14 µg/l bereikt (figuur 1). De studie van Armstrong et al. (7),



Figuur 2. De relatie tussen cTnT-resultaten (x-as) en cTnI-resultaten (y-as) in 40 monsters met kwantitatieve cTnT-uitslag (waarden tussen 0,1 en 2,0 µg/l).

gebaseerd op een gezonde referentiepopulatie van 221 personen, laat zien dat het 99^{ste} percentiel in deze populatie bij $< 0,16$ µg/l ligt. Volgens Armstrong et al. is de precisie bij 0,16 µg/l 22%, terwijl de door de ESC/ACC aanbevolen precisie van 10% pas bij 0,32 µg/l wordt bereikt. Als we er van uitgaan dat het 99^{ste} percentiel voor cTnI inderdaad lager ligt dan 0,16 µg/l dan voldoet de assay voor de bepaling van cTnI op de Advia Centaur niet aan de ESC/ACC-richtlijn. De matige precisie heeft uiteraard nadelige consequenties voor de betrouwbaarheid van een uitslag in de buurt van de referentiewaarde en dus ook voor de diagnostisch betekenis van een -in de nabijheid van de referentiewaarde geplaatst- afkappunt.

De vergelijking van de kwantitatieve cTnT-uitslagen (0,10 tot 2,00 µg/l) met de cTnI-uitslagen liet een matige correlatie tussen de twee bepalingen zien (figuur 2). Het gegeven dat de twee assays verschillende subunits van het troponinecomplex detecteren speelt hierbij waarschijnlijk een rol. Bij 16 monsters werd een positieve cTnI-uitslag gevonden terwijl de bijbehorende cTnT-uitslag negatief was. Dit beeld wordt mogelijk mede veroorzaakt door een grotere gevoeligheid van de cTnI assay. Bij twee patiënten

Tabel 2. De testuitslag van de cTnI-bepaling (Bayer) uitgezet tegen de cTnT-bepaling (Roche)

| | cTnT positief | cTnT negatief |
|---------------|---------------|---------------|
| cTnI positief | 80 | 16 |
| cTnI negatief | 1 | 23 |

Tabel 3. 12 patiënten met negatieve troponine T en positieve troponine I; alle patiënten, behalve patiënt 12, hadden cardiale klachten in de voorgeschiedenis

| Patiënt | Opnamediagnose | Concentratie cTnI (µg/l) |
|---------|--|---|
| 1 | Voorwandinfarct | 3,52 |
| 2 | Atriumfibrilleren postoperatief | 0,66 |
| 3 | Subacuut IL-infarct | 26,41 ¹ |
| 4 | Astma cardiale bij atriumfibrilleren | 0,67 |
| 5 | Angina pectoris door atriumfibrilleren met snelle VR | 0,27 |
| 6 | Angina pectoris III | 0,23/0,24 ² |
| 7 | Onstabiele angina pectoris | 0,81 |
| 8 | Acuut IPL-infarct | 0,76 ³ |
| 9 | Linksdecompensatie door atriumfibrilleren | 0,23 |
| 10 | Afwijkend ECG | 1,25 |
| 11 | Astma cardiale | 0,30/0,30 |
| 12 | Diabetische ketoacidose, rbdomyolyse | 0,17/0,72 ² /0,96 ⁴ |

¹ De discrepantie tussen cTnI en cTnT ontstaat bij deze patiënt pas op de 5e dag na het myocardinfarct. ² Tweede opvolgende bepaling. ³ De discrepantie tussen cTnI en cTnT ontstaat bij deze patiënt pas 18 dagen na het acute myocardinfarct. ⁴ Derde opvolgende bepaling.

ontstond er pas laat na het myocardinfarct een discrepantie tussen de cTnI- en cTnT-uitslagen (tabel 3, patiënt 3 en 8). Een verschil in kinetiek (afgifte aan de circulatie en afbraak) tussen cTnI en cTnT ligt mogelijk aan de basis van deze tegenstelling. De plasma-halfwaardetijd van cTnT bedraagt 120 minuten, terwijl het eiwit tot 21 dagen na een groot infarct in de circulatie aantoonbaar kan zijn (5). Mogelijk is cTnI langer in de circulatie aanwezig dan cTnT.

Concluderend kunnen we stellen dat de in deze studie gevonden analytische prestaties van de Bayer cTnI-assay goed overeenkomen met gegevens uit de recente literatuur en met de opgaaf van de fabrikant. De precisie van de assay schiet echter tekort bij lage cTnI-concentraties, hetgeen nadelige consequenties heeft voor de betrouwbaarheid van de test bij uitslagen rond de referentiewaarde. Op basis van onze resultaten concluderen wij dat de cTnI-test van Bayer, wat betreft de precisie, zou moeten worden verbeterd. Vergeleken met de semi-kwantitatieve cTnT assay van Roche (cTnT > 0,10) is de cTnI assay van Bayer bij meer patiënten met cardiale ischemie positief. Naast de evaluatie op analytisch vlak, is een zorgvuldige analyse van de klinische betekenis van lage cTn-waarden rondom het afkappunt onontbeerlijk. Voor onze situatie betekent dit dat alle cTnI-uitslagen rond de 0,16 µg/l worden gebruikt voor een evaluatiestudie, waarbij ook de klinische gegevens van de patiënt worden betrokken. Vanwege de matige precisie rond het afkappunt worden alle patiënten met een negatieve cTnI-uitslag na 6 uur opnieuw getest. Het hiermee bereikte doel is tweeledig. Enerzijds wordt een traag stijgende cTnI met deze methode op een later tijdstip alsnog gedetecteerd. Anderzijds wordt bij een negatieve cTnI door de dublobepaling een grotere diagnostische betrouwbaarheid bereikt.

Literatuur

1. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. 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: 959-969.
2. Panteghini M, Gerhardt W, Apple FS, Dati F, Ravkilde J, Wu AH. Quality specifications for cardiac troponin assays. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 175-179.

3. Apple FS, Wu AH. Myocardial infarction redefined: role of cardiac troponin testing. *Clin Chem* 2001; 47: 377-379.
4. Tate JR, Badrick T, Koumantakis G, Potter JM, Hickman PE. Reporting of cardiac troponin concentrations. *Clin Chem* 2002; 48: 2077-2080.
5. Collinson PO, Boa FG, Gaze DC. Measurement of cardiac troponins. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 423-449.
6. Advia Centaur Assay Manual. Bayer, Mijdrecht-Nederland, 2000.
7. Armstrong GP, Barker AN, Patel H, Hart HH. Reference interval for troponin I on the ACS:Centaur assay: a recommendation based on the recent redefinition of myocardial infarction. *Clin Chem* 2002; 48: 198-199.
8. Quantitative immunological test for the specific detection of cardiac troponin T. Bijsluiter. Roche Diagnostics, Mannheim-Duitsland, 2000.
9. Garber CC, Clark LW, Garrett PE, Hassemer DJ, Kotschi ML, Krouwer JS, Passey RB, Powers DM. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory methods. *NCCLS* 1993; 13: 1-54.
10. Kennedy JW, Carey RN, Coolen RB, Garber CC, Hartmann AE, Lee HT, Levine JB, Osberg I. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices. *NCCLS* 1992; 12.
11. Stiegler H, Fischer Y, Vazquez-Jimenez JF, Graf J, Filzmaier K, Fausten B, Janssens U, Gressner AM, Kunz D. Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. *Clin Chem* 2000; 46: 1338-1344.
12. Kennedy JW, Carey RN, Coolen RB, Garber CC, Lee HT, Levine JB, Osberg IM. Method comparison and bias estimation using patient samples. *NCCLS* 1993; 13: 1-51.

Summary

Performance of the Bayer cardiac troponin-I assay on the Advia Centaur. Teltling D, Foolen Y, Michels R, Schellekens APM. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2003; 28: 153-156. The precision of the Bayer troponin-I assay on the Advia Centaur was determined. At low concentration cTnI (0.35 µg/l) the precision (CV of 9.0%) was alike the reported precision in recent literature (CV of 10% at 0.32 µg/l). A precision of 22% was reported at the 99th percentile of cTnI. This poor precision can have consequences for the reliability of the test at concentrations around the reference value. The performance of the Bayer cTnI assay was also compared with the Roche Diagnostics troponin-T strip assay. At a diagnostic cut-off of 0.16 µg/l cTnI, 98.8 % of the cTnT positive samples were also cTnI positive. Furthermore, 59.0% of the cTnT negative patients were also cTnI negative. We found 12 patients with cardiac problems to be cTnI-positive, while their corresponding cTnT test was negative. Due to this finding, the Bayer assay seems to be more sensitive than the Roche assay. *Key-words: coronary syndromes, troponin, Advia Centaur, Bayer*