



Clinical Chemistry 63:1
73-81 (2017)

Mini-Reviews

Cardiac Troponin Assays: Guide to Understanding Analytical Characteristics and Their Impact on Clinical Care

Fred S. Apple,^{1*} Yader Sandoval,² Allan S. Jaffe,³ and
Jordi Ordóñez-Llanos,⁴ for the IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers

¹ Department of Laboratory Medicine and Pathology, Hennepin County Medical Center, and University of Minnesota, Minneapolis, MN; ² Division of Cardiology, Department of Medicine, Hennepin County Medical Center and Minneapolis Heart Institute, Abbott-Northwestern Hospital, Minneapolis, MN; ³ Mayo Clinic and Mayo College of Medicine, Rochester, MN; ⁴ Servei Bioquímica, IBB-Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Department de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma, Barcelona, Spain.

* Address correspondence to this author at: Hennepin County Medical Center, Clinical Labs P4, 701 Park Ave, Minneapolis MN 55415. Fax 612-904-4229; e-mail apple004@umn.edu.

Received July 22, 2016; accepted August 17, 2016.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2016.255109

© 2016 American Association for Clinical Chemistry

⁵ Nonstandard abbreviations: cTnT, cardiac troponin T; cTnI, cardiac troponin I; AMI, acute myocardial infarction; hs, high-sensitivity; ACS, acute coronary syndrome; CK, creatine kinase; POC, point of care; FAB, fragment antigen binding; URL, upper reference limits; LoQ, limit of quantification; LoB, limit of blank; LoD, limit of detection; NPV, negative predictive value; TF-CB, Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers; MI, myocardial infarction; RCV, reference change values.

译：王楠 校对：奚苏静

正确理解肌钙蛋白检测试剂的分析性能及其对于临床实践的影响

在临床实践中，肌钙蛋白检测已经成为ACS及非ACS心肌损伤患者AMI诊断、早期排查、风险评估、结局评价的标准。然而，使用这些检测试剂的临床医师、实验室人员以及科学家们却对试剂的分析性能指标缺乏足够的认识。

关于肌钙蛋白检测，目前可分为肌钙蛋白I（TnI）检测和肌钙蛋白T（TnT）检测。前者作为肌钙蛋白检测已经被广泛接受。而后者（主要由罗氏推广）在目前的一些研究中发现，一些神经肌肉性疾病和骨肌疾病可能会引起肌钙蛋白T的假象性升高（因此检验医师要清楚的认识肌钙蛋白T升高不一定代表心肌梗死的发生）。

这篇综述的目的在于对LoB，LoD和LoQ进行定义；对肌钙蛋白检测试剂分析性能评估指标进行概述；推荐适宜的统计方法对参考人群的第99分位数进行计算；阐述何为“超敏”以及变量的计算指南。

肌钙蛋白试剂概述 肌钙蛋白T

第五代超敏TnT（罗氏）使用了一对识别TnT分子中间区域的单抗的FAB片段。其中捕获抗体M7为生物素化，识别位点为125-131aa，该抗体区别于第四代所使用的抗体。检测抗体的识别位点为136-147aa，该抗体由其原型抗体M11.7经人鼠嵌合改造后而得（恒定区C1由人IgG C1替代）。该试剂经重组人TnT校准，并且与第四代校准不同，因此测试同一样本的结果也有所不同。第四代试剂的第99分位数的参考上限为10ng/L，而第五代超敏试剂的第99分位数的参考上限为30ng/L。

肌钙蛋白I

肌钙蛋白I检测的标准化至今仍然没有实现，其主要原因在于不同试剂之间抗体配对使用的差异所致。通过使用不同形式的抗原作为校准品可以使不同试剂厂家之间10倍以上的差异得到改善，但是实现标准化至今仍不现实。IFCC工

作组正在尝试使用基于混合血清的第二代参考物质使肌钙蛋白检测一致化。但即使使用复杂的计算公式，一致化仍然非常困难。此外肌钙蛋白I检测受多种因素的影响，包括水解、磷酸化、TnC复合物、肝素、异嗜性抗体和TnI自身抗体等。

关于抗体的选择，目前主要的搭配形式是将对不同抗原敏感性不同的抗体进行组合。考虑到血液中TnI的主要存在形式为TnI-C复合物，那么选择一株抗TnC的抗体可能会改善试剂的分析灵敏度。此外，所选择的抗体配对必须要能等克识别所有不同形式的抗原。

空白限 (LoB), 检测限 (LoD) 和定量限 (LoQ) 的定义：

随着超敏肌钙蛋白的问世，第99%分位数及LoQ越来越被重视，同时LoD和LoB也已经被作为AMI早期排查的Cut-off值。LoB、LoD和LoQ均能直接体现肌钙蛋白试剂低浓度检测性能，并对检验医师关于“不可检测水平”及AMI排除均有重要意义。因此，对于这三个指标的理解至关重要。LoB是重复对O值校准品进行测试，所期望能检出的最

高浓度，其计算公式为 $LoB = M + 1.645SD$ 。但是在美国，LoB不是临床可报告值。因为当不精密度 $CV > 20\%$ 时，结果会变得不可靠。LoD的浓度值高于LoB，是含有低浓度待测物样本中试剂最低能检出的浓度值。该数值能可靠地区别于LoB，因此可以被确切地作为临床输出报告。但是在美国，目前大多数临床机构依然不能使用LoD进行报告，因为现有的试剂多数的LoD浓度处的不精密度 $CV > 20\%$ ，而FDA所容许报告的最低浓度值必须要小于总不精密度 $CV \leq 20\%$ 的最低浓度。因此， $CV = 20\%$ 的最低浓度就被定义为LoQ。

第99%分位数的总不精密度：

根据CLIS EP5-A2文件的描述，日间不精密度（日间差）评价需要使用两个不同批次的试剂和校准品，在连续的20天内每天重复测试两次。临床实践中对于肌钙蛋白试剂而言，如果其99%分位数总不精密度 $CV \leq 10\%$ ，则被认定为“指南可接受”；如果其99%分位数总不精密度 $CV > 10\%$ 但是 $\leq 20\%$ ，则被认定为“临床可使用”；如果其99%分位数总不精密度 $CV > 20\%$ ，则被认定为“临床不可接受”。目前超敏肌钙蛋白试剂已经达到了指南的最高要求——第99%分

Table 1. Analytical characteristics of commercial and research contemporary, POC, and hs-cTnI and hs-cTnT assays.^a

Company/platform/assay	LoD, µg/L	99th, µg/L	% CV at 99th	10% CV, µg/L	Epitopes/antibodies ^b	Detection tag
Contemporary assays						
Abbott ARCHITECT	<0.01	0.028	15	0.032	C: 87-91, 24-40; D: 41-49	Acridinium
Beckman Access 2	0.01	0.02	14	0.040	C: 41-49; D: 24-40	ALP
Beckman Coulter DxI	0.01	0.03	14	0.040	C:41-49; D:28-80	ALP
Ortho-Clinical Diagnostics Vitros	0.012	0.034	10	0.034	C: 24-40, 41-49; D: 87-91	HRP
Siemens Centaur Ultra	0.006	0.04	10	0.030	C: 41-49, 87-91; D: 27-40	Acridinium
Siemens Dimension RxL	0.04	0.07	20	0.140	C: 27-32; D: 41-56	ALP
Siemens VISTA	0.015	0.045	10	0.040	C: 27-32; D: 41-56	Chemiluminescent
Tosoh AIA	0.06	<0.06	8.5	0.090	C: 41-49; D: 87-91	ALP
Roche 4th generation cTnT	0.01	0.01	18	0.03	C: 125-131; D: 136-147	Ruthenium
POC assays						
Abbott i-STAT	0.02	0.08	16	0.10	C: 41-49, 88-91; D: 28-39, 62-78	ALP
Alere Triage	0.05	<0.05	NA	NA	C: NA; D: 27-40	Fluorophor
bioMérieux Vidas	0.01	0.01	27	0.11	C: 41-49, 22-29; D: 87-91, 7B9	ALP
LSI Medience PATHFAST	0.008	0.029	5.1	0.014	C: 41-49; D:71-116, 163-209	ALP
Radiometer AQT90 cTnI	0.0095	0.023	17	0.039	C: 41-49, 190-196; D: 137-149	Europium
Radiometer AQT90 cTnT	0.01	0.017	20	0.03	C: 125-131; D:136-147	Europium
Response Biomedical RAMP	0.03	<0.1	18	0.21	C: 85-92; D: 26-38	Fluorophor
Roche Cardiac Reader	<0.05	<0.05	NA	NA	C: 125-131; D:136-147	Gold particules
Siemens Stratus CS	0.03	0.07	10	0.06	C: 27-32; D: 41-56	ALP
Trinity Meritas	0.019	0.036	17	NA	C: 24-40; 41-49; D: 88-90, 137-148, 190-196	Fluorophor
ET Health	0.1	0.2	NA	0.42	C: 87-91; D: 27-40	ALP
Nanomix	0.15	NA	NA	0.64	C: 87-91; D: 27-40	ALP
hs-Assays						
Abbott ARCHITECT hs-cTnI	1.2/1.9	34/16	5	3	C: 24-40; D: 41-49	Acridinium
Beckman Coulter Access hs-cTnI	2.5	52/23	<10	8	C: 41-49; D: 24-40	ALP
Ortho-Clinical Diagnostics hs-cTnI	1.0	19/16	<10	3	C:24-40, 41-49; D: 87-91	HRP
Roche E170 hs-cTnT	5	20/13	8	13	D: 125-131; C: 136-147	Ruthenium
Siemens Vista hs-cTnI	0.5	55/33	5	3	C: 30-35; D: 41-56, 171-8	Luminescence
Singulex Errena hs-cTnI	0.09	36/30	5	0.9	C: 41-49; D: 27-41	Fluorescence

^a Assays not designated as cTnI are cTnI.

^b C, capture antibody; D, detection antibody; NA, not available.

位数总不精密度 $CV \leq 10\%$ ，而其他试剂和POCT试剂的第99%分位数总不精密度则在10%到20%之间。当超敏肌钙蛋白测试结果高于99%分位数时，可以提示心肌损伤同时又不需要考虑到精密度带来的数据误差。因此，使用超敏肌钙蛋白可以显著提高诊断的准确性。不过目前指南也依然支持使用 $CV \leq 20\%$ 的肌钙蛋白试剂，因为20%的不精密度并不会导致患者风险评估的误分类。

原文表1列举目前所有的超敏肌钙蛋白试剂，均达到了第99%分位数的总不精密度 $CV \leq 10\%$ 的标准。值得一提的是，目前真正用于临床实践并一直能保持99%分位数总不精密度 $CV \leq 10\%$ 的仅有罗氏的hs-TnT和雅培的hs-TnI。

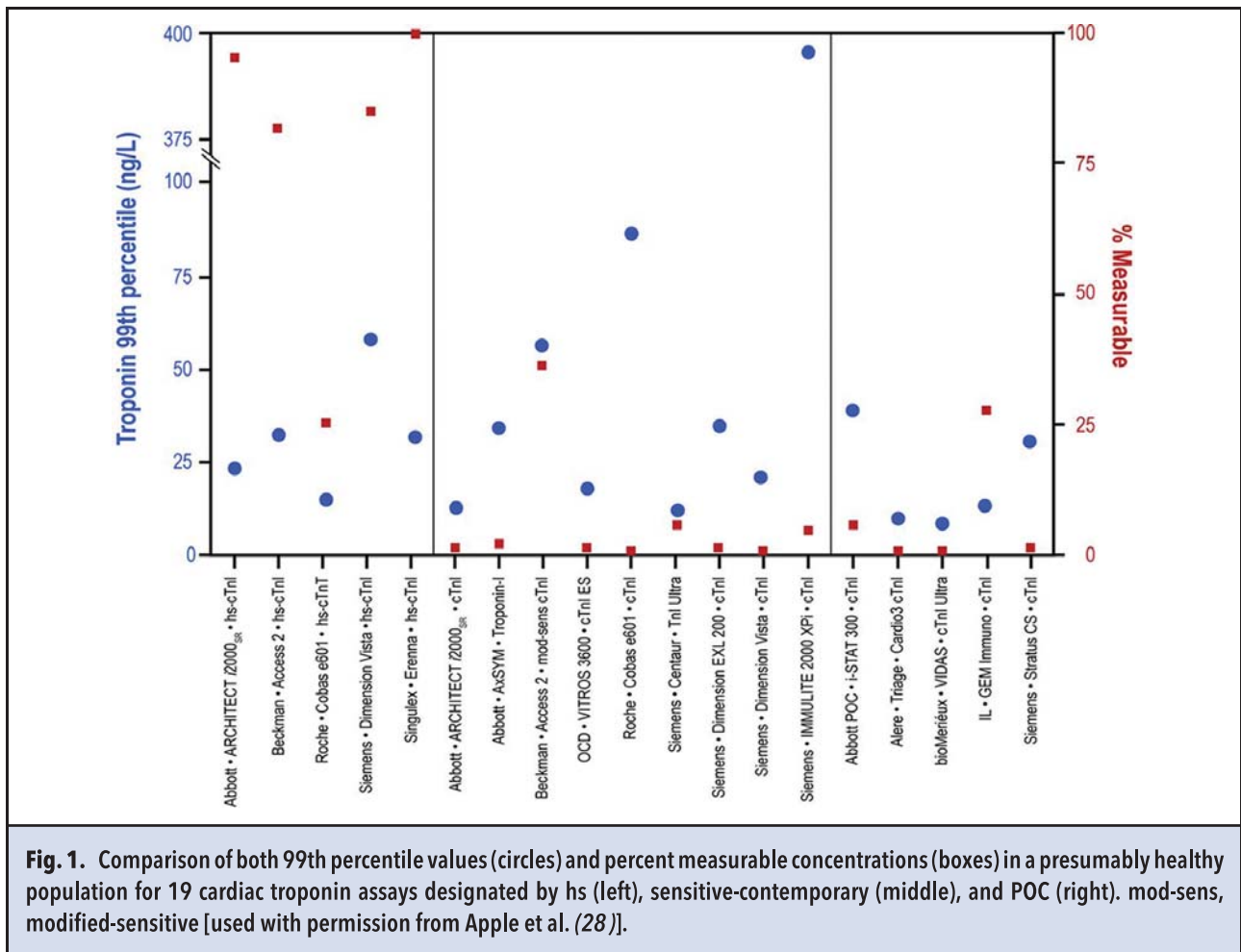
第99%分位数

肌钙蛋白的第99%分位数由AMI临床实践指南提出，其浓度值由来源于试剂生产商或者研究机构组织的健康人群所测得。对于超敏肌钙蛋白，TF-CB（IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers）已经对第99%分位数的测定做出了建议。其中性别对于该数值的影响非常重要，因此对于超敏肌钙蛋白，推荐使用性别特异性的第99%分位数。而对于其他肌钙蛋白试剂和POC试剂，由于其灵敏度仍然没有能显著区分第99%分位数的性别差异，因此仍然仅使用总第99%分位数（女性+男性）。当使用超敏肌钙蛋白I时，可以用单一的临界值对AMI进行诊断，其浓度结果应该保留完整的小数（单位为 ng/L ），以便于能区别于其他试剂。尽管研究普遍建议使用第99%分位数，然而目前仅有30%-50%的实验室使用。值得一提的是，超敏肌钙蛋白的浓度会随着年龄升高，这可能与并发症有关。根据年龄而提高参考上限将会增加诊断的复杂性，同时对于年长的健康人群也会有不利的影响。

第99%分位数测定的健康人群定义

表1中列出了目前主要肌钙蛋白试剂的第99%分位数，不同试剂之间参考人群的组成和数量基本没有一致性。关于参考人群组成的定义，目前仍然争论不休。应该选择明显健康且年轻的群体还是选择30-90岁且无已知心血管疾病的入院病人目前尚无定论。另外，对于参考人群健康的定义也存在争论：a. 对个体进行如他汀类等心脏药物的服用情况进行随访以确定健康人群；b. 根据个体是否患有如肾病和糖尿病等心血管相关疾病以确定参考人群；c. 经过心电图等心脏影像学检查等医学评估确定参考人群。使用上述的c方案筛选所得群体虽然最为理想，但是成本高昂。对使用上述标准进行人群的连续筛选，会使初始的第99%分位数向更低浓度偏移。因此文章建议使用两倍法，将30岁以下和30岁以上（年龄中位数为60-65）的人群同时入选。入选标准应基于药物治疗史（而非基于心脏药物）、已知的基础疾病情况和血液测试结果（脑钠肽可以排除心衰；肾小球过滤率可以排除基础肾病）。同时，男性跟女性应该平等参与，同时对于人种应保持多样化。关于参考人群的数量，TF-CB建议男女都应分别至少有300例入选。目前对于同一参考人群，尚没有多个试剂进行同时测定。2016年，AACC发起了一项参考区间血液绘制图研究，试剂厂商可以在此购买535例样本以进行第99%百分位数的测定。HyTest作为全球领先的心血管体外诊断原料供应商，在这项研究中也当仁不让地贡献了两例健康样本。

为了对不同试剂厂商的第99%分位数测定的差异进行研究，研究者考察了19种不同的肌钙蛋白试剂，它们测试低于第99%分位数值样本的能力介于1%-98%。结果如图1所示，由于TnI和TnT缺乏标准，不同试剂之间的差异显著，同时超敏肌钙蛋白基本可以测定参考人群全范围的样本。另外，超敏肌钙蛋白测试全范围的参考人群样本结果呈正态分布。



超敏肌钙蛋白的分析性能

如何定义“超敏”对于肌钙蛋白至关重要。IFCC对于超敏肌钙蛋白的定义如下：1.第99%分位数的CV<10%；2.对于健康人群，高于LoD的浓度值至少要能检出50%。对超敏肌钙蛋白的所有期刊、生产厂商和实验室而言，应该采用ng/L的单位进行报告以避免与其他试剂混淆。另外，如表2和图1所示，当使用IFCC的标准时，超敏肌钙蛋白T的可检出率偏低。此外，目前FDA通过的POC和其他肌钙蛋白试剂也均没有达到超敏的双重准则。雅培的超敏肌钙蛋白已经在全世界范围应用，但美国还没有被FDA通过。

性别特异性的第99%分位数

对于超敏肌钙蛋白而言，建议根据性别使用不同的第99%分位数。目前，已经有若干研究证明肌钙蛋白第99%分位数与性别有关，其中男性的值略高于女性，因为男性左心室量要高于女性。通过5种超敏肌钙蛋白对健康人群的测试数据分析发现，男性的可检出率普遍高于女性。超敏肌钙蛋白I试剂对于高于LoD值的检测能力有性别差异，但是总体检出率均高于50%。而超敏肌钙蛋白T试剂对于不同性别的检出能力差异则较大，在可检出率方面男性为43%，女性为7%。从临床角度来看，这些数据非常有意义。因为当检测结果低于LoD值且结果不可检出时，可用该单一的检测结果对AMI进行快速排除。

Table 2. Measurable values among hs-cardiac troponin assays using sex-specific cutoffs.

Manufacturer-analyzer-assay	No. of results	LoD, ng/L	Measurable values $\geq$ LoD	Proportion of undetectable values (<LoD)
Abbott ARCHITECT hs-cTnI	F: 252 ^a	1.9	F: 67% (170/252)	F: 33% (82/252)
	M: 272		M: 80% (217/272)	M: 20% (55/272)
Beckman Coulter Access hs-cTnI	F: 252	2.5	F: 74% (187/252)	F: 27% (65/252)
	M: 272		M: 87.5% (238/272)	M: 13% (34/272)
Roche Cobas e601 hs-cTnT	F: 252	5	F: 7% (18/252)	F: 93% (234/252)
	M: 272		M: 43% (117/272)	M: 57% (155/272)
Siemens Dimension Vista hs-cTnI	F: 239	0.5	F: 82% (196/239)	F: 18% (43/239)
	M: 264		M: 90% (237/264)	M: 10% (27/264)
Singulex Erenna hs-cTnI	F: 252	0.09	F: 100% (252/252)	F: 0% (0/0)
	M: 272		M: 100% (272/272)	M: 0% (0/0)

^a F, female; M, male.

第99%分位数的统计方法

关于第99%分位数的统计学方法，目前仍然没有统一标准。近日一篇研究公开建议使用更简单的非参数法对第99%分位数进行统计计算，而非Harrell-Davis 或Robust法。根据IFCC TF-CB的建议，对于90%置信区间的99%分位数，至少需要299例样本。

超敏肌钙蛋白试剂的生物变异性

目前，相比于超敏肌钙蛋白试剂，普通试剂由于灵敏度问题仍然不能对肌钙蛋白I和T的生物变异性进行评估。关于超敏肌钙蛋白试剂的生物变异性分析如Table 3所示。

使用临床准则对超敏肌钙蛋白进行定义

IFCC TF-CB已经提出了使用分析性能评估对超敏肌钙蛋白进行定义的准则。研究者认为使用临床准则对超敏肌钙蛋白进行定义可能同样非常重要。目前，IFCC TF-CB正在评估一系列临床准则以进一步对超敏肌钙蛋白进行定义。首先，MI的排除应基于肌钙蛋白浓度小于LoD值，该浓度值的NPV应大于99%，同时临床敏感性也应大于99%。第二，对于主要不良心脏事件或30天全因死亡的风险评估应以NPV>99%为基础，该准则以浓度值小于LoD值或0-1小时/0-2小时浓度值绝对 Δ 变量为标准。值得一提的是，这些准则能否应用于其他普通肌钙蛋白试剂仍有待更多研究。

Table 3. Short-term analytical and biological variation of hs-cTn assays.^a

	Abbott	Beckman	Roche (E170)	Siemens	Singulex
CV-A, % ^b	13.8	14.5	7.8	13.0	8.3
CV-I, %	15.2	6.1	15.0	12.9	9.7
CV-G, %	70.5	34.8	NA	12.3	57
Index of individuality	0.22	0.46	NA	0.11	0.21
RCV, % ^b	NA	NA	47.0	NA	NA
RCV increase, % ^c	69.3	63.8	NA	57.5	46.0
RCV decrease, % ^c	-40.9	-38.9	NA	-36.5	-32
Within-individual mean, ng/L	3.5	4.9	NA	5.5	2.8

^a Adapted with permission from Apple and Collinson (15).^b CV-A, analytical CV; CV-I, within-individual CV; CV-G, between-individual CV; NA, not available.^c RCV percentage applies to the parametric data.^d RCV increase and decrease percentages refer to nonparametric data and are log transformed.

肌钙蛋白浓度变量的使用

目前，仍然没有通用的肌钙蛋白I或肌钙蛋白T Δ 变量可用于临床敏感性的优化。不同试剂的 Δ 变量均不同且差异巨大。超敏肌钙蛋白所使用的 Δ 变量为绝对变量，而其他肌钙蛋白试剂使用的则是百分比的相对变量。另外， Δ 变量的计算很大程度上取决于时间间隔（超敏肌钙蛋白是0-1、2或3小时，其他肌钙蛋白为0-6小时）和起始测定的肌钙蛋白浓度是否高于第99%分位数。因此，在进行多试剂之间的比对时，分析时间应该保持一致。这里值得注意的是，由于部分肌钙蛋白试剂（包含POCT试剂）在99%分位数浓度附近的分析精密度不够，也会引起测定结果的小范围变化。关于超敏肌钙蛋白T，已经有研究建议在3小时区间内，使用50%的相对变量（若测定结果在99%分位数附近）和20%的相对变量（若基础值高于99%分位数）对AMI进行排除。此外，在晚期MI方面，相对变量和绝对变量的使用往往会发生混淆，这里要更加注意。

超敏肌钙蛋白的推广前准备

随着时代发展，需要为即将到来的hs-assay时代做好准备。目前，已经有一系列草案可以对已开展超敏肌钙蛋白的实验室进行指导教育，同时也可以帮助那些没有超敏肌钙蛋白的实验室开展超敏肌钙蛋白检测。首先，实验室人员应对相关文章进行深入理解作为超敏肌钙蛋白测试开展的基础。关于分析、诊断和风险评估报告应在员工会议上进行分享。第二，在使用新型超敏肌钙蛋白试剂时，用户应理解浓度数值的改变，并且不应该考虑换算因数。第三，每个实验室均需要根据IFCC TK-LB指南建立99%分位数的参考范围。第四，要针对不同性别建立不同的参考值范围，且女性的参考值要低于男性。第五，报告结果的唯一单位ng/L，并需要保留全部有效数字。第六，需要建立质控品以监控99%分位数的精密度%CV。第七，考虑使用小于LoD值作为潜在的排除指标。第八，提供早期的连续测试，如基础值、1.5小时测试和3小时测试等，并与急诊医师和心内科医师联合以制定最优的使用流程。第九，临床医师需要理解，即使出现肌钙蛋白升高，也不一定能百分百确诊MI，需要对每一位患者的病史进行考察了解。第十，严格规范样本的采集与保存，因为超敏肌钙蛋白的高灵敏度，不当的样本操作会直接影响检测结果。

Employment or Leadership:

F.S. Apple, Clinical Chemistry, AACC.

Consultant or Advisory Role:

F.S. Apple: HyTest, Philips, Metanomics.

Y. Sandoval: Roche.

A. Jaffe: Beckman Coulter, Alere, Abbott, Roche, Siemens, ET healthcare, NeuorgenomiX, Lpath, SinglueX, Novartis.

J. Ordonez-Illanos: Roche, Singulex, bioMerieux, Stat.