



Sex-Specific 99th Percentile Upper Reference Limits for High Sensitivity Cardiac Troponin Assays Derived Using a Universal Sample Bank

Fred S. Apple, ^{a, *} Alan H. B. Wu, ^b Yader Sandoval, ^c Anne Sexter, ^d Sara A. Love, ^a Gary Myers, ^e Karen Schulz, ^f Show-Hong Duh, ^g and Robert H. Christenson^g

译：王楠 校对：奚苏静

使用全球样本库建立的超敏肌钙蛋白性别特异性的第99百分位参考值上限

心肌肌钙蛋白I (cTnI) 和心肌肌钙蛋白T (cTnT) 是检测心肌损伤、支持心梗诊断的最佳标志物。第四代全球心梗定义中指出，第99百分位值不应单独用于心梗的排除与纳入诊断，需要与临床背景相结合。在超敏肌钙蛋白试剂问世前，当代肌钙蛋白试剂的诊断阈值是基于ROC曲线或CV=10%的肌钙蛋白浓度给出，部分原因是由于第99百分位值处的分析性能有待提升。随着试剂性能的提升，超敏肌钙蛋白可以提供更低的第99百分位参考值上限（99th URL）及更低的假阳性率。

第99百分位参考值上限受年龄、性别以及并发症的影响，对于入选人群也缺乏统一标准。为此AACC和IFCC心脏标志物委员会提出了一项指南并对参考人群进行了定义，其中包括临床和替代性标志物的筛查以及计算参考值范围上限的统计学方法。对于超敏肌钙蛋白，在检测正常人群时，可检出率要大于等于50%（检测浓度高于LoD）。不同试剂的灵敏度以及性别特异性的第99百分位参考值上限显著差异。目前市场上有数种超敏cTnI和cTnT试剂可供使用，但由于上述的试剂间差异，导致试剂之间缺乏可比性。

随着FDA批准的hs-cTn试剂数量的增加以及hs-cTn试剂全球应用的普及，适时对不同试剂进行直接对比是非常必要的。目前，全球对于第99百分位参考值上限的使用也尚无统一标准。如罗氏的hs-TnT试剂，在美国以外的实验室，使用的99th百分位URLs为14ng/L，而在美国所使用的则是性别特异性的参考值。本研究通过使用表观健康人群的全球样本库（USB），对9种hs-cTnI和3种hs-cTnT试剂的性别特异性99th百分位URLs进行了测试与对比。

1. 实验材料与方法：

1.1 样本

样本来自于AACC全球样本库（USB），更多信息请参考原文。

1.2 肌钙蛋白试剂

肌钙蛋白试剂的测试仪器为：Abbott Architect i2000、Beckman Coulter Access 2、ET Healthcare Pylon、Mitsubishi Pathfast、Ortho-Clinical Diagnostics VITROS 3600、

Siemens Healthineers Attelica、Siemens Healthineers ADVIA Centaur XP、Siemens Healthineers Dimension Vista 1500和Singulex Clarity。

肌钙蛋白T试剂测试仪器为：Roche Diagnostics cobas e601、e602和 ET Healthcare Pylon。更多信息请参考原文。

1.3 统计学方法

详见原文。

2. 结果与分析

2.1 样本信息

样本信息如Table 1所示，通过替代性标志物筛查，总计排除了149例样本，其中男性75例，女性74例（Fig 1和Table 2）。

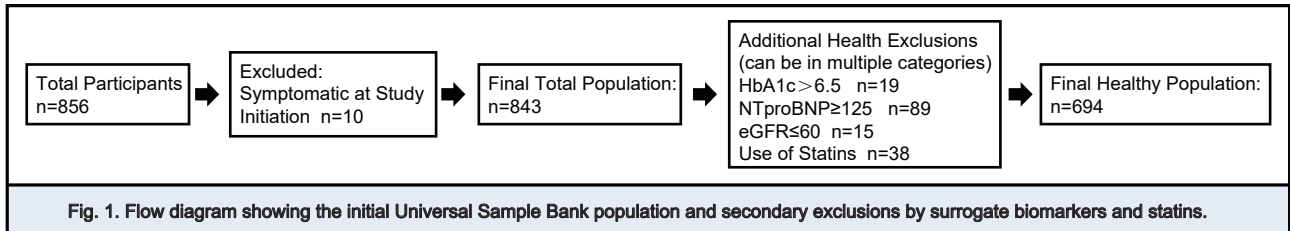


Table 1. Universal Sample Bank subject demographics.

	Pre-exclusions			Post-exclusions			
	All	Men	Women	All	Men	Women	Exclude
N	843	426	417	694	354	340	1494
Age mean (SD)	41(13)	42(13)	41(12)	40(12)	39(12)	40(12)	50(13)
Age range	19-91	20-74	19-91	19-74	20-74	19-71	21-91
Race n (%)							
Caucasian	488(57)	207(48)	281(67)	396(57)	171(48)	225(66)	92(61)
African American	228(27)	151(35)	77(18)	185(26)	123(34)	62(18)	43(28)
Pacific mean (SD) Islander/ Asian mean (SD)	91(10)	50(11)	41(9)	84(12)	44(12)	40(11)	7(4)
Other mean (SD)	29(4)	12(2)	17(4)	23(3)	11(3)	12(3)	6(4)
Hispanic n (%)	68(8)	37(8)	31(7)	56(8)	32(9)	24(7)	12(8)
HbA1C mean (SD) %	5.6(0.6)	5.6(0.8)	5.5(0.4)	5.5(0.3)	5.5(0.3)	5.5(0.3)	5.9(1.3)
NT pro-BNP mean (SD) ng/L	71(202)	65(271)	77(87)	43(28)	31(24)	54(28)	204(453)
Creatinine mean (SD) mg/dL	9(0.2)	1.0(0.2)	0.8(0.1)	0.88(0.2)	0.99(0.1)	0.75(0.1)	0.90(0.3)
Smoker n	198	132	66	167	106	61	31

2.2 cTnI

9种hs-cTnI试剂的99th百分位URLs和正常人群可检出率（高于LoD）如Table 2和Fig 2所示。其中，Siemens Vista和Singulex Clarity试剂具有最高的可检出率以及最高和最低的99th百分位URLs。整体来看，9种试剂的总可检出率为52%-99.5%，男性为63%-99.7%，女性为42%-99.4%。在女性方面，Beckman Coulter Access 2和Abbott Architect的可检出率分别为48%和42%，率低于50%的标准。试剂间的99th百分位URLs差异由试剂本身差异与统计学方法差异两方面所致，Robust统计方法给出的99th百分位URLs会相对较低。最终，9种试剂的整体URLs范围为4-26ng/L（男性：5-31ng/L，女性：3-21ng/L）。

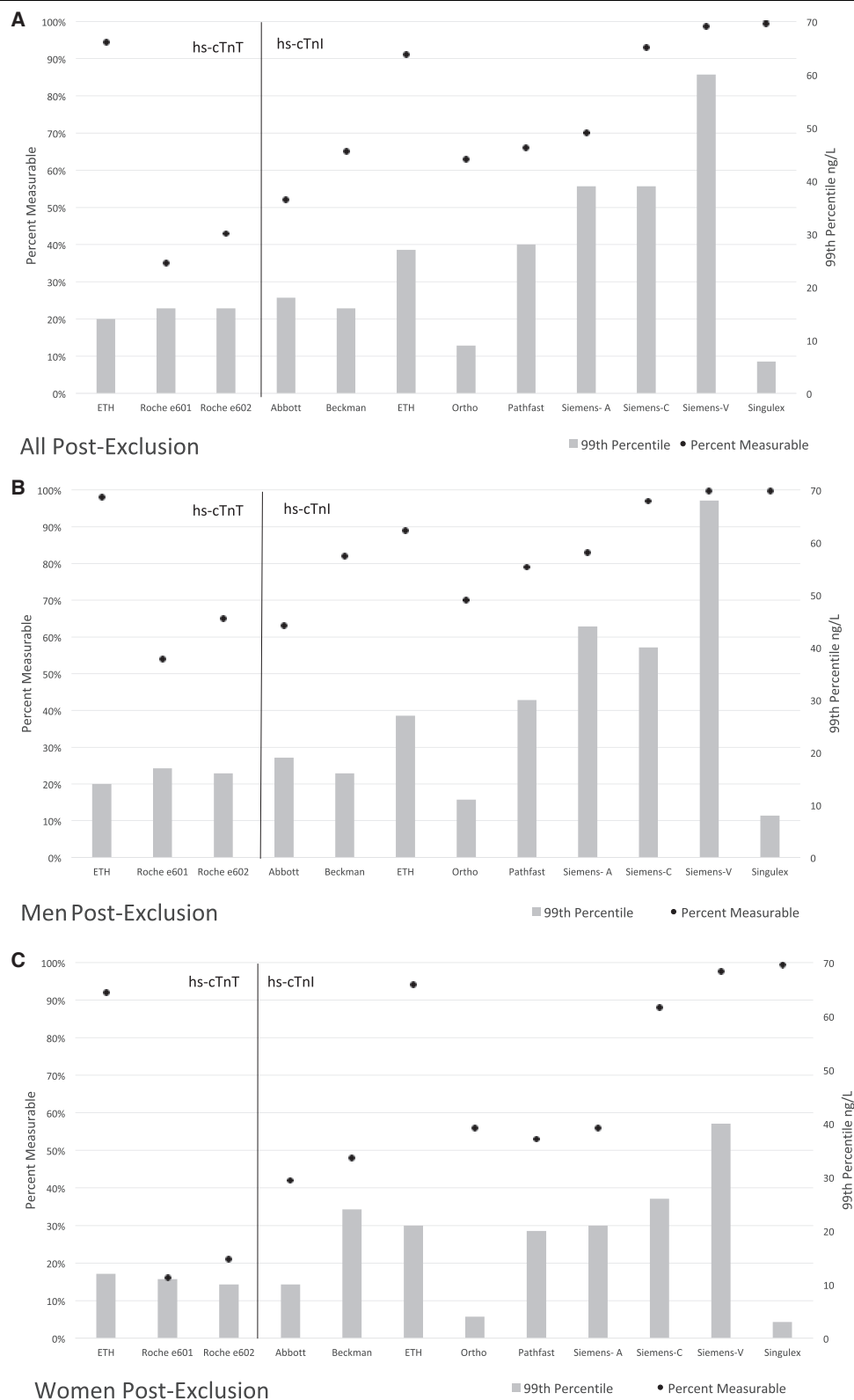


Fig. 2. Schematic representation of the hs-cTnI and hs-cTnT assays percentages of measurable concentrations ($\geq$ LoD) with 99th percentile URLs based on the post exclusion nonparametric statistic for: a) overall subjects, b) men, c) women (ETH, ET Healthcare; Siemens: A, Atellica; C, Centaur; V, Vista).

Table 2. Percentages of measurable cTn concentrations and 99th percentile URLs (with 95% confidence intervals) for the 9 hs-cTnI assays after subject exclusions, by sex and by statistical methods used.

	Abbott Architect i2000	Beckman Coulter Access 2	ET Healthcare Pylon	Ortho Clinical Diagnostics Vitros	Medience Pathfast	Siemens Attelica	Siemens Centaur	Siemens Vista	Singulex Clarity
LOD	1.9 ng/L	1.4 ng/L	1.2 ng/L	1.0 ng/L	2.3 ng/L	1.6 ng/L	1.19 ng/L	2.00 ng/L	0.08 ng/L
% Measurable	54%	67%	91%	65%	68%	71%	93%	98.8%	99.3%
Nonparametric	19 (16, 30)	18 (16, 34)	28 (19, 35)	15 (9, 26)	28 (22, 30)	38 (27, 45)	39 (35, 46)	60 (42, 80)	8 (5, 15)
Harrell–Davis	20 (15, 24)	20 (14, 25)	29 (20, 37)	15 (10, 20)	27 (20, 35)	37 (30, 44)	39 (33, 45)	59 (43, 75)	9 (5, 12)
Robust	NA	10 (8, 11)	13 (11, 15)	7 (5, 8)	15 (13, 17)	18 (15, 20)	19 (17, 21)	27 (23, 31)	4 (3, 5)
Men Only									
% Measurable	65%	84%	89%	73%	81%	84%	98%	99.8%	99.4%
Nonparametric	20 (18, 35)	18 (15, 34)	31 (17, 44)	16 (11, 29)	30 (24, 56)	44 (36, 55)	40 (36, 46)	68(42, 91)	11(7, 15)
Harrell–Davis	22 (17, 28)	19 (14, 25)	29 (19, 39)	17 (13, 21)	30 (22, 39)	43 (37, 49)	41 (36, 47)	68 (52, 84)	11 (6, 16)
Robust	NA	10 (9, 13)	14 (11, 17)	8 (6, 10)	18 (15, 21)	21 (18, 25)	21 (18, 25)	31 (18, 27)	5 (4, 6)
Women Only									
% Measurable	42%	48%	93%	56%	54%	59%	88%	97.8%	99.2%
Nonparametric	13 (10, 33)	20 (9, 39)	28 (15, 39)	5 (3, 26)	22(16, 31)	26(19, 40)	26(22, 56)	44(33, 69)	4(3, 16)
Harrell–Davis	15 (8, 22)	21 (11, 31)	28 (17, 40)	9 (0, 18)	23 (11, 34)	26 (19, 33)	33 (19, 47)	48 (33, 63)	5 (2, 9)
Robust	NA	NA	13 (10, 16)	NA	12 (10, 13)	12 (10, 15)	16 (12, 20)	22 (18, 27)	3 (2, 4)

2.3 cTnT

3种hs-cTnT试剂的99th 百分位URLs和正常人群可检出率（高于LoD）如Table 3和Fig 2所示。罗氏试剂在两种不同机型检测的可检出率均低于50%，（43%和35%）。而ET Healthcare试剂的可检出率为94%。三种试剂的男性检测结果均优于女性（ET: 96% vs. 92%, Roche e601: 65% vs.21%, Roche e602: 54% vs. 16%）。3种试剂的99th 百分位URLs存在差异，其中罗氏试剂无法使用Robust方法计算99th 百分位URLs。

Table 3. Percentages of measurable concentrations and 99th percentile URLs (with 95% confidence intervals) after subject exclusions, by sex, and by statistical methods used for 3 hs-cTnT assays.

	ET Healthcare Pylon	Roche Cobas e602	Roche Cobase601
LOD	0.8 ng/L	3.0 ng/L	3.0 ng/L
After health exclusions			
% Measurable	94%	43%	35%
Nonparametric	14 (11, 24)	16 (14, 27)	16 (13, 27)
Harrell–Davis	14 (11, 17)	17 (13, 20)	16 (13, 19)
Robust	8 (7, 10)	NA	NA
Men only			
% Measurable	96%	65%	54%
Nonparametric	14 (13, 23)	16 (15, 27)	17 (16, 27)
Harrell–Davis	17 (11, 24)	19 (12, 25)	19 (13, 25)
Robust	10 (8, 12)	11 (10, 13)	NA
Women only			
% Measurable	92%	21%	16%
Nonparametric	12 (9, 24)	10 (9, 32)	11 (9, 31)
Harrell–Davis	13 (8, 17)	14 (6, 23)	12 (8, 16)
Robust	7 (5, 9)	NA	NA

2.4 直方图

直方图结果显示，并非所有试剂结果都符合高斯分布，这是因为部分试剂由于分析灵敏度不够，在检测女性低浓度样本时，结果低于LoD。年龄分段的99th 百分位URLs 如Table 4所示，随着年龄的增长，99th 百分位URLs并未出现明显的上升趋势。

Table 4. Cardiac troponin 99th percentiles (ng/L) when stratified by age tertiles for each assay, using all subjects

Company assay	Tertile 1, <33y N = 241	Tertile 2, 33–45y N = 269	Tertile 3, 46py N = 333
ET Healthcare-Pylon	11	14	15
Roche-e602	11	15	18
Roche-e601	10	16	18
Abbott-ARCHITECT i2000	23	16	20
Beckman Coulter-Access 2	24	18	18
Ortho Clinical Diagnostics-Vitros	6	9	20
Medience-Pathfast	29	19	24
Siemens-Attelica	43	38	30
Siemens-Centaur	43	35	38
Siemens-Vista 63	63	47	55
Singulex Clarity	5	7	15

该研究对于临床及检验人员使用超敏肌钙蛋白99th百分位URLs具有重要的教育价值：

1. 不同试剂之间，性别特异性的99th百分位URLs存在巨大差异，并且缺乏标准化。肌钙蛋白在血液中以多种形式存在，试剂厂商由于使用的抗体组合不同，识别不同形式肌钙蛋白的效率也会有所不同。关于不同抗体识别不同形式肌钙蛋白的效果，可以参考HyTest研究团队19年发表的文章（参考文献20）。这也与不同试剂测试正常人的结果相关，并且独立于肌钙蛋白的释放机制。就99th百分位URLs而言，男性的结果普遍高于女性。在建立参考值时，需要考虑性别差异，并且需要具有代表性。通过USB样本库建立的99th百分位URLs与试剂厂商所提供的99th百分位URLs存在显著差异。通过严格的表现健康人群选择标准，进一步剔除可能患有潜在并发症的人群（使用替代性标志物如eGFR、糖化血红蛋白和利钠肽等），可以进一步降低参考值。同时，影像学检查结果也应作为表现健康人群筛选的重要组成。虽然现阶段不建议建立种族/年龄特异性的参考值，但是已经有一些研究指出，白人的99th百分位URLs会略低于非裔美国人。关于参考人群数量（C-GB建议是男女至少各300例）以及参考人群定义，尚无统一标准。虽然越来越多文献支持性别特异性的99th百分位URLs，但是该提议仍未被完全证实。相比于总99th百分位URLs，女性特异性的99th百分位URLs会偏低，这将会提升肌钙蛋白敏感性，同时还能提高MI的检出率。在危险分层方面，文献指出，使用低于总/女性的99th百分位URLs的截断值可以提高预后效果，因此可以使用参考值范围内连续的hs-cTn检测结果进行危险分层分析。
2. 关于99th百分位URLs的计算，建议使用非参数法。该方法计算过程相对简单，且计算结果与复杂的Harrell Davis bootstrap方法非常接近。不建议使用Robust法，尤其对于女性参考值的建立。因为该方法依赖于中位数附近的变异，若低端分析灵敏度不够，可能无法得到计算结果。此外，由于该方法最初主要用于95%参考区间计算，因此在计算99th百分位URLs时，可能会低估参考上限。同时，本研究建议试剂厂商应该公开其对于表现健康人群纳入与排除的标准以及所使用的统计学计算方法。
3. 并非所有试剂均满足超敏标准（正常人群的可以检出率高于50%），尤其对于女性人群。其中，两种罗氏hscTnT试剂在检测女性人群时，均未满足标准；Beckman和Abbott hscTnI试剂在检测女性人群时，检出率也略低于50%。不同试剂的LoD存在差异，这也是影响检出率的因素之一。试剂对于LoD浓度之上的低浓度样本的检出能力非常重要，这可以使临床医师更好地使用肌钙蛋白的连续变化进行早期的排除与纳入。
4. 建立性别特异性的99th百分位URLs的标准化流程可以提高数据之间的可比性，并保证诊断准确性、结果风险评估和研究的一致性。随着试剂分析性能的提升，临床医师可以根据单次检测低于LoD的结果进行MI排除；同时，对于非缺血性肌钙蛋白升高（无MI），肌钙蛋白连续检测也是有意义的，这需要试剂具有优秀的参考值范围内检出能力。
5. 99th百分位URLs需来源于参考人群，且仅限于那些无既往病史或相关标志物升高的亚临床疾病人群。对于肌钙蛋白结果出现连续升高，无论是是否高于99th百分位URLs，均可提示预后风险。

6. 不建议使用围绕99th百分位URLs建立置信区间，这可能会混淆URL的定义。然而，对置信区间的了解可以教育临床医生更好地理解任何定量测量均不能代替临床判断、患者症状和病史。
7. 参考人群中若涵盖更多60岁以上人群，得到的结果可能会更高。已经有若干研究报道，肌钙蛋白有随年龄增加而上升的趋势。